



B13

①9 **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 46 173 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 9/00**  
C 12 N 5/16

②① Aktenzeichen: 199 46 173.2  
②② Anmeldetag: 20. 9. 1999  
④③ Offenlegungstag: 5. 4. 2001

DE 199 46 173 A 1

⑦① Anmelder:  
Forschungsinstitut für die Biologie  
landwirtschaftlicher Nutztiere, 18196 Dummerstorf,  
DE

⑦④ Vertreter:  
Uexküll & Stolberg, 20354 Hamburg

⑦② Erfinder:  
Seyfert, Hans Martin, 18196 Kessin, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
WO 92 13 102 A1  
Barber M.C. u.a.: Elucidation of a promotor  
activity that directs the expression of acetyl-  
CoA carboxylase  $\alpha$  with an alternative N-terminus  
in a tissue-restricted fashion, In: Biochem. J.,  
1998, Vol. 333, S. 17-25;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Expression der bovinen Acetyl-Coenzym A Carboxylase  $\alpha$

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die eine DNA-Sequenz aufweisen, welche für bovine Acetyl-Coenzym A Carboxylase  $\alpha$  kodiert und/oder die Expression dieses Enzyms in der Milchdrüse von Rindern reguliert. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Hemmung der Expression von Acc $\alpha$  in der Milchdrüse von nicht-menschlichen Säugern sowie transgene nicht-menschliche Säuger.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Nukleinsäuren, welche DNA-Sequenzen umfassen, die

a) die in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 dargestellte Sequenz;

b) eine allelische Variante davon oder

c) eines Fragmentes der Sequenzen nach a) oder b) aufweisen, wobei ein Fragment mindestens einen der Bereiche von Nukleotid 933 bis 966, 2188 bis 2219 oder 3055 bis 3495 der SEQ ID NO: 1, den Bereich von Nukleotid 1 bis 441 der SEQ ID NO: 2 oder den entsprechenden Bereich einer allelischen Variante umfaßt.

Die Erfindung betrifft ferner Vektoren, insbesondere Expressionsvektoren, die entsprechende Nukleinsäuren umfassen. Dabei sind Expressionsvektoren bevorzugt, die Nukleinsäuren umfassen, die den Bereich von Nukleotid 2188 bis 2219 der SEQ ID NO: 1 oder den Bereich von Nukleotid 1 bis 3445 der SEQ ID NO: 1 umfassen.

DE 199 46 173 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die eine DNA Sequenz aufweisen, welche für bovine Acetyl-Coenzym A Carboxylase  $\alpha$  kodiert und/oder die Expression dieses Enzyms in der Milchdrüse von Rindern reguliert. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Hemmung der Expression von Acc $\alpha$  in der Milchdrüse von nichtmenschlichen Säugern.

Mit zunehmender Bedeutung der Verfahren zur Erzeugung von transgenen Tieren und insbesondere der Expression von rekombinanten Proteinen in der Milch von transgenen Tieren gewinnen induzierbare Promotoren, welche die Expression von Genen in der Milchdrüse kontrollieren, ebenfalls an Bedeutung. Beispielsweise ist es wünschenswert, die Expression der Enzyme zu kontrollieren, die die Zusammensetzung der Milch beeinflussen.

Die bovine Acetyl-Coenzym A Carboxylase  $\alpha$  ist ein Enzym, das in der Milchdrüse induzierbar exprimiert wird und die Zusammensetzung der Milch wesentlich beeinflusst.

Acetyl-Coenzym A besteht aus Essigsäure, die über eine Thioester-Bindung an die Sulfhydrylgruppe von Coenzym A gebunden ist. Acetyl-Coenzym A besitzt ein hohes Acetyl-Gruppenübertragungspotential und ist deshalb ein wichtiges Zwischenprodukt bei einer Vielzahl von Biosyntheseverfahren der Zelle.

Acetyl-Coenzym A Carboxylase  $\alpha$  (E.C. 6.4.1.2; nachfolgend als Acc $\alpha$  bezeichnet) ist eines der Enzyme, die für die Synthese langkettiger Fettsäuren im Zytoplasma von Säugetieren benötigt werden. Acc $\alpha$  katalysiert die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA durch Aaslagerung einer CO<sub>2</sub>-Gruppe an den C<sub>2</sub>-Körper des Acetyl-CoA, wodurch dieser zu einem C<sub>3</sub>-Körper verlängert wird. Bei dieser Reaktion handelt es sich um den Raten-limitierenden Schritt der Fettsäuresynthese (Numa, S. und Tanabe, T., Fatty acid metabolism and its regulation, Herausgeber S. Numa, New York 1984, 1-27).

Eine Vielzahl von Isoformen der Acetyl-Coenzym A Carboxylase wurde inzwischen isoliert. Dabei unterscheidet man zwischen einer Acc $\alpha$  mit einem Molekulargewicht von 265 kDa und einer Acc $\beta$  mit einem Molekulargewicht von 275 bis 280 kDa, sowie zwischen verschiedenen Isoformen der Acc $\alpha$ , die durch unterschiedliches Spleißen der mRNA erzeugt werden. Obwohl davon ausgegangen wird, daß Acc $\alpha$  primär die Synthese langkettiger Fettsäuren im Zytoplasma von Säugetieren reguliert, während Acc $\beta$  an der Oxidation der Fettsäuren in den Mitochondrien beteiligt ist, konnte eine klare Aufteilung der verschiedenen Isoformen nach enzymatischer Aktivität experimentell nicht belegt werden (Ki-Han Kim, Annu. Rev. Nutr., Vol. 17 (1997), 77-99). Die Proteinsequenz der Acc $\beta$  unterscheidet sich von der Sequenz der Acc $\alpha$  hauptsächlich im N-terminalen Bereich.

Fettsäuren erfüllen im Organismus eine Vielzahl von Funktionen, beispielsweise werden sie als Grundstoff für die Membransynthese, als Reservestoff oder als Nahrungsquelle für Säuglinge eingesetzt. Daher wurden aktive Acc $\alpha$  Enzyme in einer Vielzahl von Zellen, darunter Zellen des fettspeichernden Gewebes, der Leber und der Milchdrüse, gefunden (Ki-Han Kim a.a.O.).

Die Aktivität der Acc $\alpha$  und die Rate der Fettsäuresynthese einer Zelle schwanken in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen, wie Hormonen, der Zusammensetzung der Nährmedien, der Entwicklungsbedingungen und von genetischen Faktoren (Ki-Han Kim a.a.O.). Aufgrund der vielfältigen Verwendung der Fettsäuren erfolgt die Regulation der enzymatischen Aktivität der Acc $\alpha$  sowohl auf der Ebene der Transkription und Translation als auch durch Aktivierung und Inaktivierung des Proteins.

Acc $\alpha$  und  $\beta$  sind Phosphoproteine, die bis zu 9 Mol Phosphat pro Mol Enzym tragen können. Acc $\alpha$  kann durch Phosphorylierung inaktiviert werden. In Versuchen mit Acc $\alpha$ , dessen Aminosäuresequenz an bestimmten Positionen verändert worden war, wurde festgestellt, daß die Phosphorylierung von Serin in Position 1200 für die Inaktivierung durch cAMP-abhängige Protein-Kinase und die Phosphorylierung von Serin in Position 79 für die Inaktivierung durch 5'-AMP-abhängige Protein-Kinase notwendig ist (Ha et al., J. Biol. Chem., Vol. 269, 22162-22168; und Ki-Han a.a.O.).

Eine erste Beschreibung des für Acc $\alpha$  kodierenden Genes der Ratte wurde von López-Casillas et al. durchgeführt (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85 (1988), 5784-5788). Dabei konnte gezeigt werden, daß dieses Gen gewebespezifisch von unterschiedlichen Promotoren 1 und 2 (PI und PII) exprimiert wird (López-Casillas et al., Gene, Vol. 83 (1998), 311-319). Es wurden jedoch nur die im 5'-Bereich des Gens gelegenen Exons charakterisiert, wobei festgestellt wurde, daß Exon 5 das Startsignal für die Eiweißsynthese des Enzyms trägt.

Inzwischen wurde auch die cDNA des Acc $\alpha$  Gens vom Menschen kloniert (Abu-Elheiga et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92 (1995), 4011-4015). Das Gen erstreckt sich über etwa 460 Kb.

Ferner konnte das für Acc $\beta$  kodierende Gen des Menschen identifiziert werden (Widmer et al., Biochem. J., (1996), 915-922).

Die Kontrolle der Acc $\alpha$ -Aktivität über die Expression des Gens von den Promotoren PI und PII ist im Stand der Technik ausführlich dargestellt worden. Auf der Ebene der Genexpression erfolgt die Kontrolle in zwei Stufen:

- (i) Differenzierungs-abhängige und physiologische Aktivierung verschiedener Promotoren; sowie
- (ii) Ausbildung verschiedener Spleißvarianten der mRNA, die sich im 5'-nicht-translatierten Bereich unterscheiden

Es konnten fünf verschiedene Formen von Acc $\alpha$  mRNA identifiziert werden, die durch Expression von PI oder PII aus und verschiedene Spleißvorgänge der Transkripte erzeugt werden. Über die physiologische Bedeutung dieser Spleißvarianten ist nichts bekannt, obwohl die verschiedenen mRNAs Gewebe-spezifisch, also in Abhängigkeit des Zustands des Gewebes exprimiert werden.

Die Transkription vom Promotor PI führt zu Klasse 1 mRNAs, die Exon 1 an ihrem 5'-Ende aufweisen, während die Transkription vom PII-Promotor zu Klasse 2 mRNAs führt, welche Exon 2 als 5'-Ende aufweisen (Ki-Han a.a.O.).

Von der Ratte weiß man bezüglich der Promoteraktivierung, daß PI in der Leber und in adiposem Gewebe aktiv ist, durch die Stoffwechsellage des Tieres (Fasten/Anfüttern führt zu starker Aktivierung, Laktation praktisch zur Abschaltung in adiposem Gewebe) reguliert wird und in der Milchdrüse zu allen Zeiten inaktiv ist.

Der PII-Promotor ist in fast allen Geweben konstitutiv aktiv. Der PII-Promotor der Ratte weist ferner Ansatzstellen für

Vermittler extra-zellulärer Signale auf (z. B. Insulin, Glukose-reguliertes Element, cAMP). Das zeigt, daß die Aktivität dieses – an sich konstitutiven – Promotors zusätzlich in Abhängigkeit von der Stoffwechsellaage des Tieres reguliert wird. So wurde beispielsweise die Expression der verschiedenen Acc $\alpha$ -Isoformen in der Milchdrüse während und nach der Schwangerschaft bestimmt. Dabei wurde festgestellt, daß die Aktivität des PII-Promotors unmittelbar nach der Geburt stark ansteigt, während eine Aktivität des PI-Promotors während dieser Phase nicht nachgewiesen werden konnte. Aus diesen Befunden wurde gefolgert, daß die Aktivität der Acc $\alpha$  in der Milchdrüse vom PII Promotor reguliert wird (Ki-Han a.a.O.).

In der Ratte wurden Bindungssequenzen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren im Bereich der Sequenz des PI und PII-Promotors identifiziert (Ki-Han a.a.O.; Tac et al., J. Biol.Chem. 269 (1994) 10475–10488). Bezüglich ihrer entwicklungspezifischen Aktivierung ist jedoch nichts bekannt.

Bei der Klonierung der Acc $\alpha$  cDNA des Schafes wurden Transkripte unterschiedlicher Länge erhalten (Barber et al., Gene, Vol. 154 (1995), 271–275). Dabei wurde festgestellt, daß es sich um die Expression der für Acc $\alpha$  kodierenden DNA von unterschiedlichen Promotoren aus handelt. In erweiternden Studien konnte beim Schaf ein bis dahin unbekannter, dritter Promotor (PIII) nachgewiesen werden, der insbesondere während der Laktation die Expression der Acc $\alpha$  aktiviert (Barber et al., Biochem. J., Vol. 333 (1998), 17–25). Der PIII-Promotor liegt im Intron 5 des Gens und die Expression von diesem Promotors aus führt zur Bildung einer mRNA, deren Sequenz sich im 5'-Bereich (in den ersten 17 Aminosäuren) von der Sequenz aller anderen Acc $\alpha$  mRNA-Sequenzen unterscheidet, da das dem PIII nachgeordnete Exon 5A nur bei Expression von diesem Promotor transkribiert wird. Von Exon 6 ab ist die Sequenz dieser mRNA identisch mit der Sequenz der übrigen Acc $\alpha$  mRNA-Moleküle. Expression von dem PIII aus führt ferner zu einem Acc $\alpha$ -Enzym, dessen Aminosäuresequenz 58 Aminosäuren kürzer als die übrigen Acc $\alpha$ -Isoformen ist (die insgesamt 2347 Aminosäuren enthalten).

Von dem PIII-Promotor des Schafes sind jedoch bislang lediglich 350 bp bekannt, auf denen keine Bindungssequenzen für laktationsspezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Über die Sequenzen, welche eine Milchdrüsen-spezifische Expression der Acc $\alpha$  bei Nutztieren kontrollieren, ist fast nichts bekannt.

Insbesondere DNA-Sequenzen, die eine Expression der Acc $\alpha$  beim wichtigsten Nutztier des Menschen, nämlich beim Rind, steuern, wurden ebenfalls im Stand der Technik noch nicht beschrieben. Die Sequenz könnte als Laktations-spezifischer, induzierbarer Promotor zur Expression von beliebigen Genen in der Milch von transgenen Säugetieren verwendet werden.

Die Verfügbarkeit dieser Sequenzen hätte ferner den Vorteil, daß der Fettgehalt der Milch gezielt verändert werden könnte. Die Reinigung rekombinanter Proteine aus der Milch transgener Kühe kann beispielsweise durch den hohen Fettgehalt der Milch sehr aufwendig sein. Ein weiterer Vorteil von Milch mit verringertem MilCHFett-Gehalt wäre, daß sogenannte Magermilch aus entsprechenden Kühen gewonnen werden könnte, ohne daß das MilCHFett zuvor entfernt werden müßte.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die DNA-Sequenzen aufweisen, welche für den Milchdrüsen-spezifischen Promotor der Acc $\alpha$  und/oder das Strukturgen der Acc $\alpha$  des Rindes kodieren.

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Nukleinsäuren gelöst, welche DNA-Sequenzen umfassen, die

- a) die in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 dargestellte Sequenz;
- b) eine allelischen Variante davon; oder
- c) eines Fragmentes der Sequenzen nach a) oder b)

aufweisen, wobei ein Fragment mindestens einen der Bereiche von Nukleotid 933 bis 966, 2188 bis 2219 oder 3055 bis 3495 der SEQ ID NO: 1, den Bereich von Nukleotid 1 bis 441 der SEQ ID NO: 2 oder den entsprechenden Bereich einer allelischen Variante umfaßt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden als "allelische Varianten" natürlicherweise auftretende Variationen der für die bovine Acc $\alpha$  kodierende DNA-Sequenz oder der entsprechenden PIII-Promotorsequenz bezeichnet.

Durch die vorliegende Erfindung werden erstmals Nukleinsäuren mit der Sequenz des Laktations-spezifischen Promotors der bovinen Acc $\alpha$  (SEQ ID NO: 1) sowie der entsprechenden cDNA (SEQ ID NO: 2) zur Verfügung gestellt. Diese Nukleinsäuren sowie bestimmte Fragmente davon können zur Expression von Fremdgenen in der Milchdrüse von Rindern und zur Genotypisierung von Rindern verwendet werden.

Ferner ermöglicht die vorliegende Erfindung die Erzeugung transgener, nicht-menschlicher Säugetiere, deren Milch einen verringerten Fettgehalt aufweist. Dafür werden die DNA-Sequenzen, die für den Milchdrüsen-spezifischen Promotor der Acc $\alpha$  oder für das Acc $\alpha$ -Strukturgen kodieren, im Genom von nicht-menschlichen, transgenen Säugetieren mindestens teilweise durch eine Sequenz ersetzt, die durch Deletion oder Substitution von einzelnen oder mehreren Nukleotiden so verändert wurde, daß die Expression der Acc $\alpha$  in der Milchdrüse gehemmt wird.

Bei der Sequenzanalyse der SEQ ID NO: 1 wurde festgestellt, daß der PIII Promotor der bovinen Acc $\alpha$  eine Hauptbindungssequenz (sogenannte "high affinity binding site") und 10 kooperative DNA-Bindungsdomänen (sogenannte "low affinity binding sites") für den Transkriptionsfaktor STAT5 aufweist (vgl. Übersichtsdarstellung Fig. 6A), wobei insbesondere der Bereich der Nukleotide 2188 bis 2219 der SEQ ID NO: 1 eine Häufung von mehreren STAT5-Bindungssequenzen aufweist. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß die STAT5-Bindungssequenzen für die Promotoreigenschaften des PIII der Acc $\alpha$  wesentlich sind.

Als STATs ("signal transducers and activators of transcription") werden Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die durch Interaktion mit bestimmten Zelloberflächenrezeptoren aktiviert werden und – als Folge dieser Aktivierung – in den Zellkern einwandern und an bestimmte DNA-Sequenzen binden können (James E. Darnell, Science, Vol. 277 (1997), 1630–1635). Die meisten STATs sind etwa 750 bis 795 Aminosäuren lang und benötigen den COOH-terminalen Bereich für die Genaktivierung.

STAT 5A wurde als Wachstumsfaktor der Milchdrüse isoliert, der an den  $\beta$ -Casein-Promotor bindet (Wakao et al.,

EMBO J., Vol. 13 (1994), 2181–2191). STAT 5B weist eine Aminosäure-Sequenzhomologie von mehr als 90% zu STAT 5A auf und konnte ebenfalls in der Milchdrüse nachgewiesen werden. Obwohl ein proximales Promotorelement des  $\beta$ -Caseingens der Ratte zum Nachweis von STATSA-Aktivierung und DNA-Bindung verwendet wurde, war die Synthese von  $\beta$ -Casein in den STATSA deletierten (sogenannten "knock-out"-) Mäusen möglich. Das saure Molkeprotein ("whey acidic protein") konnte jedoch in diesen Mäusen nicht mehr exprimiert werden. Die Bedeutung der STAT5-Bindungsstellen für die quantitative Regulation Laktations-spezifischer Expression der Gene ist daher von dem jeweiligen Gen abhängig.

Die DNA-Bindungsmotive für STAT5 Faktoren wurden kürzlich identifiziert. Eine Hauptbindungssequenz (TTCNNNGAA, die "highaffinity-site") wird von der zentralen DNA-bindenden Domäne der STAT5 Faktoren gebunden (Darnell, JR, J. E. Science 277 (1997) 1630–1635; Becker et al., Nature 394 (1998) 145–151). Halbseiten dieses Palindroms werden von der Nterminalen Domäne gebunden, der sogenannten "kooperativen DNA-Bindungsdomäne" ("low-affinitysites"; Vinkemeier et al., EMBO J. 15 (1996) 5616–5626; Xu et al., Science 273 (1996) 794–797)).

#### Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1 Sequenz des PIII-Promotors der bovinen Acc $\alpha$ .

Fig. 2 cDNA-Sequenz der von dem PIII-Promotor gebildeten Acc $\alpha$ .

Fig. 3 Aminosäure-Sequenz der von dem PIII-Promotor gebildeten Acc $\alpha$ .

Fig. 4 Vergleich der Aminosäure-Sequenz der von dem PIII-Promotor gebildeten Acc $\alpha$  mit der von dem PI-Promotor gebildeten Acc $\alpha$ .

Fig. 5A Nachweis des PIII-Promotors im Genom; Restriktionspaltung von DNA des Klon 91, wobei die folgenden Enzyme verwendet wurden:

B, BamHI; D, DraI; E, EcoRI; EV, EcoRV; H, HindIII; K, KpnI; P, PvuII; Sc, ScaI; St, StuI; X, XhoI.

Fig. 5B Southern-Blot des Gels nach Fig. 5A, wobei als Sonde Exon 5A aus Klon 357\_2 verwendet wurde.

Fig. 6A Expression vom PIII-Promotor der bovinen Acc $\alpha$ ; Struktur der verwendeten Deletionsklone.

Fig. 6B Expression vom PIII-Promotor der bovinen Acc $\alpha$ ; Expressionsfrequenz der Deletionsklone in stabil transfizierten HC-11 Zellen.

Fig. 7 Genomische Anordnung der Acc $\alpha$  Promotoren beim Rind.

Fig. 8 Expression der Acc $\alpha$  vom PIII- und PII-Promotor in verschiedenen Geweben; die folgenden Gewebe wurden eingesetzt:

M: Marker; 1: Leber; 2: Adipose Gewebe; 3: Niere; 4: Gehirn; 5: Muskel; 6: Lunge; 7: Mischdrüse, nichtlaktierend; 8: laktierende Milchdrüse; K: PCR Kontrolle (identischer Ansatz ohne RNA).

Fig. 9 Verwendung des Mikrosatelliten zur Genotypisierung.

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, welche DNA-Sequenzen umfassen, die

- a) die in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 dargestellte Sequenz;
- b) eine allelischen Variante davon; oder
- c) eines Fragmentes der Sequenzen nach a) oder b)

aufweisen, wobei ein Fragment mindestens einen der Bereiche von Nukleotid 933 bis 966, 2188 bis 2219 oder 3055 bis 3495 der SEQ ID NO: 1, den Bereich von Nukleotid 1 bis 441 der SEQ ID NO: 2 oder den entsprechenden Bereich einer allelischen Variante, umfaßt.

Die Erfindung betrifft ferner Vektoren, insbesondere Expressionsvektoren, die entsprechende Nukleinsäuren umfassen. Dabei sind Expressionsvektoren bevorzugt, die Nukleinsäuren umfassen, die den Bereich von Nukleotid 2188 bis 2219 der SEQ ID NO: 1 oder den Bereich von Nukleotid 1 bis 3445 der SEQ ID NO: 1 umfassen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Expressionsvektoren zur Verfügung gestellt, in denen die Nukleotide 2188 bis 2219 der SEQ ID NO: 1 oder 1 bis 3445 der SEQ ID NO: 1 operativ mit einem Strukturgen verknüpft sind. Als Strukturgen wird der Bereich eines Gens bezeichnet, der für ein Polypeptid kodiert. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können beliebige Strukturgene verwendet werden, wobei eine Verwendung von Fremdgenen (beliebigen Genen, die nicht für die natürliche Acc $\alpha$  Sequenz kodieren) bevorzugt ist.

Diese Ausführungsform der Erfindung weist den besonderen Vorteil auf, daß beliebige Fremdgene unter der Kontrolle des Laktationsspezifischen und induzierbaren Promotors der Acc $\alpha$  exprimiert werden können.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die entsprechende Vektoren enthalten. Vorzugsweise handelt es sich dabei um eukaryotische Zellen, wobei nicht-menschliche Säugetierzellen, insbesondere Milchdrüsenepithelzellen, besonders bevorzugt sind.

Die Vektoren können nach beliebigen, im Stand der Technik bekannten Verfahren in die Wirtszellen eingebracht werden.

Beispielsweise kann die Liposomentechnik verwendet werden, wobei die Verwendung des LIPOFECTAMIN Reagentiensatzes der Firma GIBCO/BRL, entsprechend den Angaben des Herstellers, besonders bevorzugt ist.

Die vorliegende Erfindung umfaßt ferner transgene nichtmenschliche Säugetiere, die Zellen aufweisen, die einen entsprechenden Vektor enthalten.

Entsprechende Verfahren zum Austausch von DNA-Sequenzen im Genom von Säugetierzellen sind als "gene targeting" bekannt und erlauben den Einbau von Sequenzen an bestimmte Stellen in das Genom von Säugetieren (Tybulewicz et al., Cell, Vol. 65 (1991), 1153–1163; Liu et al., Genes & Dev., Vol. 11 (1997), 179–186). Dabei ist auch der Genaustausch selektiv in ausgewählten Gewebetypen – und nur in diesem Gewebe – möglich (Kühn et al., Science, Vol. 269 (1995), 1427–1429).

Im wesentlichen beruhen diese Verfahren auf der Beobachtung, daß Gewebekulturzellen extern zugesetzte, gereinigte DNA im Austausch zu einem homologen, im Zellkern vorhandenen Genombereich, in ihr Genom aufnehmen. Dieser

Prozess wird homologe Rekombination genannt. Bei Säugern erfolgt er spontan mit geringer Rate (ca.  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  Austauschereignisse/pro Zelle) in Differenzierungszuständen jenseits der Meiose.

Die Rekombination kann genutzt werden, um z. B. Deletionen oder Substitutionen einzelner oder mehrerer Nukleotide in einem Gen oder einem Promotor zu setzen. Dabei kann man beispielsweise ein größeres Stück (5–10 kbp) des Zielgenes isolieren, eine begrenzte Deletion einführen und dieses Konstrukt in Gewebekulturzellen des gleichen Organismus transfizieren.

Nach Rekombination kann auf Zellen selektiert werden, die das Konstrukt aufgenommen haben. Entsprechende Klone, in denen ein vollständiger Austausch tatsächlich erfolgt ist, werden beispielsweise durch Southern-Blot-Analysen verifiziert. Zellkerne mit verändertem Genom werden isoliert. Durch Klonierung können transgene Nutztiere erzeugt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird aus dem Bereich des PIII-Promoters der Acc $\alpha$  ein 3 kbp umfassendes HindIII Fragment isoliert, welches das vollständige Exon 5A beherbergt für entsprechende Austauschklonierungen mit einem "gene-targeting"-Vektor geeignet ist. Die 5'-gelegene HindIII Restriktionsschnittstelle findet sich an Position 2960 der SEQ ID Nr 1. Die in diesem Abschnitt genannten DNA-Abschnitte stellen jedoch lediglich Beispiele dar. Basierend auf der vorliegenden Erfindung ist es ohne weiteres möglich beliebig andere Promotor- oder Genabschnitte zu isolieren, die für einen entsprechenden Austausch geeignet sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung einer Nukleinsäure zur Expression von beliebigen Fremdgenen, wobei die DNA-Sequenz der Nukleinsäure die Nukleotide 2188 bis 2219 der SEQ ID NO: 1 umfaßt, die operativ mit einem Strukturgen verknüpft sind. Gemäß einer bevorzugten Abwandlung dieser Ausführungsform umfaßt die Nukleinsäure die Nukleotide 1 bis 3445 der SEQ ID NO: 1.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung zur Expression von Fremdgenen kann die Expression in eukaryotischen Zellen erfolgen, wobei die Expression in Zellen eines nicht-menschlichen Säugetiers, insbesondere in der Milchdrüse, bevorzugt ist.

Die vorliegende Erfindung stellt ferner Verfahren zur Verfügung, mit denen transgene, nicht-menschliche Säugetiere erzeugt werden können, deren Milch einen verringerten Fett-Gehalt aufweist. Bei diesen Verfahren verändert man die Sequenz des Milchdrüsen-spezifischen Promotors der Acc $\alpha$  oder des Acc $\alpha$ -Strukturgens im Genom des transgenen nicht-menschlichen Säugetiers durch Deletion oder Substitution von einzelnen oder mehreren Nukleotiden so, daß die Expression der Acc $\alpha$  in der Milchdrüse gehemmt wird.

Dabei kann ein entsprechendes Verfahren Schritte umfassen, bei denen man:

- a) eine Nukleinsäure erstellt, welche eine DNA-Sequenz umfaßt, die durch Deletion oder Substitution von einzelnen oder mehreren Nukleotiden von der DNA-Sequenz des Milchdrüsen-spezifischen Promotors der Acc $\alpha$  oder von der DNA-Sequenz des Acc $\alpha$ -Strukturgens abgeleitet wurde;
- b) die Zelle eines nicht-menschlichen Säugetiers mit der Nukleinsäure nach Stufe a) transfiziert;
- c) Zellen, in denen die natürliche DNA-Sequenz im Genom durch die entsprechende Nukleinsäure nach Stufe a) ausgetauscht wurde, auswählt und zu Tieren regeneriert.

Vorzugsweise handelt es sich bei den transgenen nichtmenschlichen Säugetieren um Rinder, Schafe oder Ziegen.

Bei den Verfahren zur Erzeugung von nicht-menschlichen transgenen Säugetieren, deren Milch einen verringerten Milchfett-Gehalt aufweist, sind Verfahren bevorzugt, bei denen die Sequenz des Milchdrüsen-spezifischen Promotors der Acc $\alpha$  die Sequenz von Nukleotid 1 bis 3054 der SEQ ID NO: 1 umfaßt. Die mindestens eine Substitution oder Deletion kann im Bereich von Nukleotid 2205 bis 2213 der SEQ ID NO: 1 vorgenommen werden, wobei Substitutionen oder Deletionen im Bereich von Nukleotid 2188 bis 2239 der SEQ ID NO: 1 bevorzugt sind. Diese Bereiche des Promotors der Acc $\alpha$  weisen eine hohe Dichte an STAT5-Bindungssequenzen auf. Bereits die Deletion oder Substitution einzelner Nukleotide führt zu einer verringerten Laktations-spezifischen Expression der Acc $\alpha$ . Aufgrund der konstitutiven Expression dieses Enzyms von dem PII-Promotor aus, erleiden die Tiere durch diese Veränderung des Genoms keine Nachteile.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verfahren zur Erzeugung von nicht-menschlichen transgenen Säugetieren, deren Milch einen verringerten Milchfett-Gehalt aufweist, zur Verfügung gestellt, bei denen man mindestens eine Substitution oder Deletion im Bereich von Nukleotid 3055 bis 3495 der SEQ ID NO: 1 vornimmt. Beispielsweise könnte in dem genannten Bereich ein Stop-Codon eingeführt werden. Alternativ dazu kann man den gesamten Bereich von Nukleotid 3055 bis 3495 der SEQ ID NO: 1 deletieren. Bei den hier genannten Bereichen handelt es sich um DNA-Sequenzen, die nur in der von dem PIII-Promotor exprimierten cDNA vorliegen. Durch Veränderungen im Laktationsspezifischen Bereich der cDNA der Acc $\alpha$  ist wiederum eine Verringerung der induzierbaren Acc $\alpha$ -Expression möglich, die sich nicht negativ auf die Gesundheit und das Wohlbefinden der Tiere auswirkt.

Die Erfindung betrifft dementsprechend auch transgene nichtmenschliche Säugetiere, die nach einem der obigen Verfahren erzeugt wurden und deren Milch einen verringerten Milchfett-Gehalt aufweist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verfahren zur Gewinnung von Milch mit verringertem Milchfett-Gehalt zur Verfügung gestellt, bei dem man die Milch von entsprechenden transgenen, nicht-menschlichen Säugetieren gewinnt.

Im Bereich der Nukleotide 933 bis 966 der SEQ ID NO: 1 wurde ein polymorpher Mikrosatellit identifiziert, der sich hervorragend zur Genotypisierung von Rindern eignet. Eine Genotypisierung von Rindern unter Verwendung dieser Sequenz weist den besonderen Vorteil auf, daß ein bestimmter Genotyp unmittelbar mit einer bestimmten Expressionsmenge der Acc $\alpha$  während der Laktation und daher auch mit einem bestimmten Fettgehalt der Milch korreliert werden kann. Die Gewinnung einer Population von Rindern, die einen besonders hohen oder geringen Fettgehalt in der Milch aufweisen, ist daher auch durch klassische Zuchtverfahren möglich, indem solche Tiere miteinander gekreuzt werden, deren Genotyp auf eine entsprechende Aktivität des PIII-Promotors der Acc $\alpha$  hinweist.

Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Genotypisierung von Rindern, bei denen man

eine DNA-Sequenz des Genoms eines Rindes analysiert, wobei die DNA-Sequenz die Nukleotide 933 bis 966 der SEQ ID NO: 1 umfaßt.

Die Analyse der DNA-Sequenz kann eine Amplifikation der DNA mittels PCR umfassen, wobei vorzugsweise Primer eingesetzt werden, die in der PCR Reaktion mit den DNA-Sequenzen des Rindes hybridisieren, welche die Nukleotide 933 bis 966 der SEQ ID NO: 1 flankieren. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Form der Erfindung werden für die PCR die Primer:

AccmsP3f 5'-CATTATCTGGCTTTGCATCTTAG und  
AccmsP3r 5'-CAGGTGGTCACAAAGAGTCTG

verwendet.

Die Analyse der amplifizierten DNA-Sequenz kann nach beliebigen Verfahren aus dem Stand der Technik erfolgen, beispielsweise kann die Analyse der Sequenz mittels Gelelektrophorese des amplifizierten Fragmentes durchgeführt werden.

## Beispiel 1

### Materialien und Verfahren:

#### 1.1 Klonierungen

Alle Klonierungen wurden in handelsüblichen Vektoren vorgenommen. PCR Produkte wurden in den Vektor pKS+ (Stragene, LaJolla; USA) oder in den Vektor "pGEM Teasy" (Promega) kloniert. Expressionssequenzen für die Überprüfung der Promotoreigenschaften wurden in dem promotorlosen Vektor "pGL3 basic" (Promega) kloniert, der für das Reporter-Enzym Luciferase kodiert.

#### 1.2 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit den Sequenzierungsanlagen 310 (Perkin-Elmer, ABI) oder Licor 4200 (MWG) durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden mit Reagentiensätzen durchgeführt, die von den Anbietern der Sequenzierungsanlagen empfohlen werden.

#### 1.3 PCR-Amplifikationen

Generell wurden "touch-down" Programme eingesetzt, entsprechen den Angaben von Don et al., 1991 (Nucl. Acids Res. Vol. 19, 4008). Oligonukleotidprimer wurden grundsätzlich so gestaltet, daß ihre optimale Anlagerungstemperatur (AT) 60 °C betrug, abgeleitet entsprechend der Faustformel: 2°C für jede A oder T Base und 4°C für G oder C. Oligonukleotidprimer wurden von der Firma ARK (Darmstadt) synthetisiert.

In einem typischen Programmablauf wurde, ausgehend von 70°C Anlagerungstemperatur (AT), in jedem der ersten 20 Zyklen, die AT um 0,5°C je Zyklus abgesenkt. Sodann wurden 30 weitere Zyklen mit jeweils 60°C AT angeschlossen. Ein Programmzyklus beinhaltete: Denaturierung bei 94°C, 1 min, gefolgt von 0.5 min bei AT zur Primer-Anlagerung, sowie eine Elongationsdauer von 3 min bei 70°C.

#### 1.4 RT-PCR

Amplifikationen von mRNA Abschnitten wurden nach Überschreibung der RNA durch das Enzym "Reverse Transkriptase" (SuperScript, von GIBCO BRL) entsprechend den Angaben des Herstellers für diesen Reagentiensatz durchgeführt. Als Startermoleküle für die cDNA-Synthese wurden typischerweise 25 pH des Sequenz-spezifischen Primeroligonukleotids eingesetzt, für einen 25 µl Reaktionsansatz. Als Matrizen dienten gesamt RNA Proben der entsprechenden Gewebe, die mit Reagentiensätzen von QIAGEN zur RNA-Extraktion gewonnen wurden.

#### 1.5 Expression von Reporter-Gen-Konstrukten in Gewebekulturzellen

Zur Überprüfung der Promotoreigenschaft von DNA-Fragmenten wurden Zellkulturen der murinen Milchdrüsenepithelzelllinie HC-11 (Ball et al., EMBO J. Vol. 7 (1988), 2089–2095) stabil mit entsprechenden Reporter-Gen-Konstrukten transfiziert. Von dieser permanenten Zelllinie ist bekannt, daß sie auf die Gabe des Laktationshormons Prolaktin unter geeigneten Kulturbedingungen mit einer Steigerung der  $\beta$ -Caseinsynthese reagieren kann (Ball et al., 1988, am angegebenen Ort).

Die Zellen wurden entsprechend den Angaben von Welte et al. (Mol. Endo., Vol. 8, 1091–1102) in RPMI-1640 Medium gehalten, welchem 10% fötalem Kälberserum, 10 ng/ml EGF und 5 µg/ml Insulin zugesetzt wurden. Für die stabile Transfektion dieser Zellen mit den entsprechenden Reporter-Gen-Konstrukten wurde ein übliches Transfektionsverfahren verwendet, welches auf der Liposomentechnik basiert. Zur Transfektion wurde der LIPOFECTAMIN Reagentiensatz entsprechend den Angaben des Herstellers (GIBCO BRL) verwendet.

Typischerweise wurden zur Transfektion der Zellen einer Kulturschale mit 9 cm Durchmesser 4 µg des linearisierten Reporter-Gen-Konstruktes mit 1 µg des linearisierten Plasmides pSV2neo als Selektionsmarker für das Antibiotikum G418 vermischt.

Die Technik der Kointegration von unabhängigen Reporter-Gen-Konstrukten und diesem Selektionsmarker wurde von Southern & Berg beschrieben (J. Mol. Appl. Genet. Vol. 1 (1982), 327–341).

Als Ergebnis einer solchen Transfektion wurden für jedes Reporter-gen-Konstrukt etwa 60–200 resistente Klone je transfizierter Kulturschale erhalten, die als Gruppe ("pool") gemeinsam aufgezogen wurden. Diese Gruppen wurden später auf die Expression der Reporter-gen-Konstrukte hin analysiert.

In Anlehnung an die Angaben von Welte et al. (a.a.O.) erfolgte die Analyse der Induzierbarkeit der Promotoren mittels Prolaktin durch einen Vergleich der Reporter-gen-Aktivität von Kulturen, die für zwei Tage konfluent im Wachstumsmedium gehalten wurden, mit der Aktivität von Kulturen, die für zwei Tage konfluent in einem Medium mit lediglich 5% FKS und ohne EGF, jedoch angereichert mit 0,1 µM Dexamethason und 5 µg/ml ovinem Prolaktin (SIGMA), gezogen worden waren.

Die Reporter-gen-Aktivität (Luciferase-Aktivität) wurde mit dem DUAL-LIGHT Reagentsatz von Perkin-Elmer entsprechend den Angaben des Herstellers gemessen. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein handelsübliches Luminometer (Firma BERTHOLD) eingesetzt. Die Enzymaktivität wird als Relative-Light-Units (RLU), angegeben. Die RLUs werden angegeben als 1000 RLUs je 10000 Zellen (vgl. Fig. 6A und B).

#### Beispiel 2

#### Isolierung der Milchdrüsen-Isoform der bovinen Accα cDNA

##### A) Erstellung der Accα cDNA-Sequenz entsprechend der vom Promotor PI gebildeten mRNA

Zur Erlangung von Informationen zur Gengstruktur der bovinen Accα wurde in Vorversuchen die von dem PI-Promotor aus gebildete cDNA-Sequenz isoliert.

Zunächst wurde durch den Sequenzvergleich der publizierten humanen und Hühnchen cDNA-Sequenzen konservierte Primersequenzen abgeleitet:

Accf: 5'-GGTTATTTTCAGTGTTCCTGCTG und  
Accr: 5'-AGCAGTCCACCGTCGCTCA.

Die Amplifikation eines 530 bp langen cDNA Stückes der Accα des Rindes erfolgte in RT-PCR Amplifikationen unter Verwendung dieser Primer und von Gesamt-RNA aus Milchdrüsen Gewebe.

Das erhaltene cDNA Stück wurde subkloniert und sequenziert sowie als Hybridisierungssonde zur Isolation von genomischen Klonen aus einer Rinder-Genbank eingesetzt. Diese Genbank war in dem Bakteriophagen λ-EMBL3 angelegt worden und bereits mehrfach zur Isolation von bovinen Genen eingesetzt worden (Kozcan et al., Nucl. Acids Res. Vol. 19, (1991), 5591–5596; Seyfert et al., Gene, Vol. 143 (1994), 265–269).

Mittels dieser Sonde wurden dann aus der genannten Genbank zwei λ-Phagen isoliert, die Teilstücke des bovinen Accα Genes trugen (Laborbezeichnung λ-Ac2 und λ-Ac3). Sie wurden genutzt, um erste Exons dieses Gens festzulegen. Wie sich später herausstellte, wurde hiermit Exon 9, das am weitesten im 5'-Bereich gelegene Exon des Gens isoliert. Von diesem Exon wurde nun ein nach 5'- gerichteter Primer abgeleitet und in Kombination mit einem, von der mittlerweile publizierten, ovinen cDNA-Sequenz der Accα abgeleiteten Primer von Exon 5 zur Isolation eines weiteren Teilstückes des bovinen Accα Genes eingesetzt. Unter Verwendung boviner genomischer DNA als Matrize entstand in "long-span" PCR Experimenten ein 14 kbp Amplifikat, von dem nach Subklonierung und Sequenzierung die Sequenzen der Exons 6–8 abgeleitet werden konnten.

##### B) Identifizierung der im 3'-Bereich gelegenen cDNA-Sequenzen

Die Identifizierung der im 3'-Bereich gelegenen cDNA-Sequenzen erfolgte in RT-PCR Experimenten, wobei die Primer unter Rückgriff auf die cDNA-Sequenz des Schafes abgeleitet wurden.

Mit diesen Verfahren konnte der größte Teil der bovinen cDNA Sequenz der Accα wurde ermittelt werden. Durch Kenntnis der Exon/Intron-Segmentierung des Gens war es ferner möglich, zwei Primer abzuleiten, die das Exon 5 des Gens (253 bp) als singuläre Bande amplifizieren:

Accx5f 5'-CTCTGAGGGCTCGTTTTCAAG;  
Accx5r: 5'-CTCATGTGTAAGGCCAAACCAT).

Diese Primersequenzen wurden dazu verwendet, um aus einer bovinen genomischen BAC-Genbank (BAC, "bacterial artificial chromosome"; Beschreibung der Bank in Cai et al., Genomics, Vol. 29 (1995), 413–425) einen BAC-Klon zu isolieren, der den 5'-Bereich des bovinen Accα Genes enthält. Dieser Klon erhielt die Laborbezeichnung "BAC91" und diente als Ausgangsmaterial zur Isolation des Promotors PIII, wie im folgenden dargestellt wird.

Durch Kenntnis der Exon/Intron Segmentierung im Bereich des Genanfanges konnten hochspezifische Primer ermittelt werden, die für aussagekräftige RT-PCR Experimente sehr hilfreich waren, basierend auf RNA Proben aus der Milchdrüse. Hierfür wurde nach 5'- gerichtete Primer:

Accx6-7r 5'-TGGCGATGAGAACCTTCTCAATC

verwendet, dessen eine Hälfte an Exon7 bindet (kursiv), während der restliche Bereich von Exon 6 kodiert wird. Dieser Primer bindet unter üblicher Stringenz der PCR-Reaktion nicht an genomische DNA. Die Verwendung dieses Primers in RT-PCR Experimenten verhindert die unbeabsichtigte Bindung an genomische DNA, was zu falschen Ergebnissen führen könnte.



C) Erstellung der Acc $\alpha$  cDNA Sequenz entsprechend der von PIII synthetisierten mRNA (SEQ ID NO: 2; Fig. 2)

Zur Erstellung der cDNA-Sequenz ausgehend von Acc $\alpha$  mRNA-Molekülen aus der laktierenden Milchdrüse, wurde eine Gesamt-RNA-Probe dieses Gewebes eingesetzt, um mit dem "MARATHON" 5'-RACE Kit (Reagentiensatz) der Firma CLONETECH cDNA Kopien in klonierter Form zu erhalten. Der Reagentiensatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Dabei wurde ausgehend von 4  $\mu$ g gesamt RNA aus Milchdrüsen-gewebe einer laktierenden Kuh und dem Acc $\alpha$  spezifischen Primer Acex6-7r (Position 587-565 der cDNA-Sequenz; siehe oben) eine cDNA erstellt, mit dem genannten Reagentiensatz von CLONETECH doppelsträngig gemacht und an das 5'Ende der mitgelieferten "Adaptor"-Sequenz ligiert.

Anschließend wurde der 5'-Bereich der Acc $\alpha$  cDNA in zwei PCR-Reaktionen unter Verwendung der Primer Acex6-7r, als Acc $\alpha$  spezifischem, nach 5'- gerichtetem Primer, sowie zunächst dem Adaptor-Primer 1, in einer ersten PCR-Amplifikationsrunde amplifiziert. Mit dem Adaptor-Primer 2 wurde in einer zweiten, "nested" PCR Amplifikationsrunde nochmals amplifiziert. Beide Adaptor-Primer sind in dem Reagentiensatz von CLONETECH enthalten.

Das knapp 600 bp lange PCR-Fragment dieser Amplifikationsrunde wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt und mit dem Genspezifischen Primer Acex6-7r direkt sequenziert (ABI310). Von dieser Sequenz wurde ein weiter innenliegender, nach 5'- gerichteteter, "nested"-Primer abgeleitet:

bAc\_5Ar1 5'-TCTCTTCAGCTGTCGTCGGCCTTG,

(entsprechend cDNA-Position 358-340). Dieser Primer wurde eingesetzt, um von 1  $\mu$ l-Restmenge des Reaktionsproduktes der ersten PCR-Runde und unter Verwendung des Adaptor-Primers 1 ein klonierbares PCR-Produkt zu erzeugen. Dies erbrachte Klone mit etwas unterschiedlicher Einsatzlänge.

Sequenzierung des Klones mit dem längsten cDNA Einsatz (357\_2) erbrachte eine neue Sequenz von 358 bp, die nicht zur Leber-spezifischen Variante der bovinen Acc $\alpha$  cDNA gehörte. Den Beweis über die Zugehörigkeit der cDNA-Sequenz von Klon 357\_2 zur bovinen Acc $\alpha$  erbrachte eine RT-PCR, in der RNA aus der laktierenden Milchdrüse des Rindes zur cDNA-Synthese mit dem genannten Primer Acex6-7r amplifiziert wurde. In der nachfolgenden RT-PCR Reaktion wurde das Oligonukleotid:

bAc\_SAr2 5'-AGGCGGAAGCTGCTGAGATCTAC,

(Position 34-56 der cDNA Sequenz, abgeleitet von der Sequenz des Klons 357\_2) mit dem auf Exon 6 gelegenen Oligonukleotid:

bAc\_Ex6m 5'-CAAATTCTGCTGGAGAGGCTACA,

(Position 539-517 der cDNA-Sequenz, bekannt aus den Vorversuchen von der leberspezifischen Acc $\alpha$ -cDNA Sequenz) kombiniert und zur Amplifikation eines 506 bp langen Fragmentes genutzt. Dieses Fragment wurde als Klon 392 kloniert und sequenziert.

Die Sequenzierungen von Klon 357\_2 und 392 ergeben die beigefügte cDNA-Sequenz der bovinen Acetyl-CoA-Carboxylase- $\alpha$ , wie sie in der Milchdrüse vorliegt (SEQ ID NO: 2; Fig. 2).

Die Sequenz der Reste 1-441 weicht deutlich von der Leberspezifischen Isoenzymform ab. Erst ab Position 442 der SEQ ID NO: 2 sind die Sequenzen identisch (entspricht Position. 568 der Leber-spezifischen Isoenzymform). Translation dieser cDNA Sequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz des Proteins wird in SEQ ID NO: 3 gezeigt (Fig. 3; siehe auch vergleichende die Darstellung in Fig. 4).

Durch Vergleich dieser Sequenz mit den in den Vorversuchen ermittelten Teilsequenzen und der Acc $\alpha$ -Genstruktur zeigt, daß der 5'-terminale, zur Leber-spezifischen cDNA divergierende Sequenzabschnitt ein eigenes Exon darstellt, welches an Exon 6 des den Strukturbereich des Genes kodierenden Abschnitt angespießt wird.

## Beispiel 3

50

Isolierung des Promotors III (PIII) der bovinen Acc $\alpha$ 3.1 Die Isolation des bovinen PIII der Acc $\alpha$  wurde ausgehend von

- zwei Oligonukleotidprimern die von der oben dargestellten cDNA-Sequenz abgeleitet wurden (bAc\_5Ar1, siehe oben; bAc\_5Ar2 (5'-CCACACAGC-ATCAGCTGATTTC, Position 132-111 der cDNA);
- dem in den Vorversuchen erwähnten Klon BAC91; und
- dem "Genome-Walker" Reagentiensatz von CLONETECH (entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt);

60

vorgenommen. Im Prinzip umfaßt das Isolationsverfahren die folgenden Schritte:

- (i) der Zerschneidung der DNA des Gesamtgenoms oder von einem bereits isolierten Teilabschnitt des Genoms mit stumpf schneidenden Restriktionsendonukleasen;
- (ii) Ligation von Adaptoren bekannter Sequenz an die doppelsträngigen DNA-Enden; sowie
- (iii) der nachfolgenden PCR-Amplifikation des gesuchten Genomabschnittes, durch den Einsatz eines Genspezifischen Oligonukleotides, in Kombination mit einem an den Adaptor bindenden Oligonukleotid.

65



## 3.2 Detaillierter dargestellt, wurde der Promotor III in folgender Weise isoliert

Die DNA des Klon BAC91 wurde vollständig mit dem Restriktionsenzym EcoRV gespalten. Die Adaptor-Oligonukleotide aus dem Reagentsatz wurden anligiert. In zwei aufeinanderfolgenden PCR-Amplifikationsrunden wurde mit den Primerkombinationen (i) bAc\_5Ar1 (Gen-spezifisch) und Adaptor-Primer 1 (Reagentsatz) sowie (ii) bAc\_5Ar2 (Gen-spezifischer "nested" Primer)/Adaptor-Primer 2 (Reagentsatz, innenliegend im Vergleich zu Adaptor-Primer 1) ein 3,2 kbp langes PCR-Amplifikat erhalten.

Die Enden des PCR-Produktes wurden mit dem Klenow-Enzym vollständig aufgefüllt, das Produkt mit SalI gespalten (Schnittstelle im Adaptor-Primer 2), und in den SalI, kombiniert mit SmaI, gespaltenen Vektor pKS+ (STRATAGENE) einkloniert. So wurde Klon 364 erhalten.

Grundsätzlich könnte die Isolation des in Klon 364 enthaltenen bovinen Genombereiches mit diesem Verfahren auch unter Verwendung von einem DNA-Präparat des Gesamtgenoms an Stelle von Klon BAC91 durchgeführt werden. Der Einsatz von BAC91 erhöht jedoch die Konzentration der Acc $\alpha$  spezifischen Genabschnitte um den Faktor 1000. Dies erleichterte die Vermehrung des gesuchten Genomabschnittes in den PCR-Reaktionen und vermied eine Analyse falscher Amplifikate.

Die vollständige Sequenzierung des Klon 364, basierend auf segmentweiser Subklonierung und unter Einsatz weiterer, anhand der Sequenzierungsergebnisse abgeleiteter Oligonukleotid-Primer führte zu der PIII-Promotorsequenz der Acc $\alpha$  (Position 1-3186, SEQ ID NO: 1; Fig. 1). Das Sequenzende, von Position 3187-3690, wurde durch Direktsequenzierung des BAC91 Klonen erhalten, unter Verwendung des von der cDNA abgeleiteten Oligonukleotidprimers bAc\_5Af2 (siehe oben).

Der Vergleich der Promoter- mit der cDNA-Sequenz zeigt, daß das Transkript, welches zu cDNA Klon 357\_2 geführt hat, bei Position 3055 dieser Sequenz beginnt. Damit ist diese Position als +1 eines Exons ausgewiesen. Das Exon endet mit Position 3495, wie durch den Vergleich mit der cDNA-Sequenz ersichtlich und in Kombination mit der Tatsache, daß das nachfolgend stehende "GT"-Dinukleotid in aller Regel den 5'-Spleißdonor eines Introns darstellt. Das Startkodon "ATG" für die Eiweißsynthese des Enzymes Acc $\alpha$  findet sich an Position 3443-3445.

## 3.3 Charakteristika der Sequenz

Die Sequenz stellt einen Promotor ohne "TATA-Box" dar, weist jedoch eine Vielzahl von DNA-Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren auf.

Bei Position 2205 beginnt das Sequenzmotiv TTCGTGGAA, welches eine Hauptbindungsstelle für den Transkriptionsfaktor STAT3 darstellt (vgl. Fig. 1).

Zwischen Position 932 und 967 liegt ein Mikrosatellit mit 18 Wiederholungen des Dinukleotids "TG". Dieser Mikrosatellit ist in unterschiedlichen Tieren polymorph, kann mit den Oligonukleotidprimern AccmP3f (5'-CATT-TATCTGGCTTTGCATCTTAG, Position 801-824) in Kombination mit AccmP3r (5'-CAGGTGGTCACAAA-GAGTCTG, Position 998-978) zur Typisierung von in der Natur vorkommenden, allelischen Varianten dieses Promotors genutzt werden (vgl. Beispiel 6).

Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen zur Erstellung der Expressionsklone (siehe Beispiel 4):

EcoRV Schnittstelle (Position 1-6, Sequenz GATATC, Spaltung in GAT-3'/5'-ATC): Die ersten drei Nukleotide dieser Schnittstelle wurden ergänzt, denn die zur Erstellung von Klon 364 verwendete DNA des BAC91 war vollständig mit diesem Enzym gespalten worden. Genomisch ist eine Schnittstelle an dieser Position vorhanden, es werden jedoch die ersten drei Nukleotide durch den Schnitt der Restriktionsendonuklease verloren. Daher befindet sich diese Schnittstelle nicht mehr in Klon 364.

PvuII: An Position 3173 findet sich eine PvuII-Schnittstelle. Diese wurde genutzt, um aus Klon 364 den Promotorbereich bis Position 3172 auszuschneiden, in Kombination mit KpnI (5'-gelegene KpnI Schnittstelle in dem Klonierungsbereich des Vektors pKS+), und Einklonierung in den KpnI/SmaI gespaltenen Expressionsvektor pGL3 basic (PROMEGA). Dies erbrachte den in Fig. 6A dargestellten Expressionsklon 1 (Labornummer 397).

EcoRI: Bei Position 677 findet sich eine Schnittstelle für dieses Enzym. Zur Deletion der 5'-gelegenen Promotoranteile wurde Klon 397 mit KpnI/EcoRI vollständig gespalten, die Überhänge mit Klenow-Enzym geglättet und der Vektor stumpf religiert. Dies erbrachte den dargestellten Expressionsklon 2 (vgl. Fig. 6A; Labornummer 422).

MstII: Die singuläre MstII Schnittstelle bei 2345 wurde zur Deletion der 5'-gelegenen Promotorabschnitte genutzt: Klon 397 wurde mit KpnI und MstII vollständig gespalten, die Überhänge mit Klenow-Enzym aufgefüllt und der Vektor stumpf religiert. Dies erbrachte den Expressionsklon 3 (vgl. Fig. 6A; Labornummer 423).

Genomische Anordnung des PIII in Relation zu anderen Exons der bovinen Acc $\alpha$ :

"Long-span" PCR Amplifikationen (mit dem Reagentsatz von ROCHE/BOEHRINGER, Primer AccEx5f und bAc\_5Ar1 und BAC91 als Matrize) zeigten, daß PIII etwa 15 kbp 3'-von Exon 5 gelegen ist. Der Promotorbereich liegt etwa 5,8 kbp 5' vor Exon 6, wie ebenfalls mittels "long-span" PCR Amplifikationen mit den Primern bAc\_5Af2 und bAc\_Ex6m zeigten. In Fig. 6A ist die ungefähre genomische Anordnung der übrigen Promotoren der bovinen Acc $\alpha$  dargestellt, sowie die Kenntnis bezüglich der anderen Exons in diesem Genabschnitt zusammengefaßt.

## Beispiel 4

## Nachweis der Promotoreigenschaft von PIII

Die Erstellung von Expressionskonstrukten mit dem Promotor PIII und zwei Deletionsvarianten (Expressionsklon 2 und 3; vgl. Fig. 6A; ) wurde in Beispiel 3 dargestellt.

Diese Konstrukte wurden stabil in die murine Milchdrüsenepithelzelllinie HC-11 transfiziert und jeweils als Gruppen von 60-100 Klonen aufgezogen. Jede dieser drei verschiedenen Gruppen stabil transfizierter Zellen wurde in sechs Kul-

turschalen ausgebracht (übliche Kulturplatten mit 6 Vertiefungen). Alle Zellkulturen wurden nach der Aussaat bis zur Konfluenz gezogen. Sodann wurde von jedem Konstrukt die Hälfte der Subkulturen (drei Schalen) für weitere sechs Tage in Wachstumsmedium (10% fötales Kälberserum) belassen. Die andere Hälfte wurde nach dem Erreichen der Konfluenz für zwei Tage in Hungermedium gehalten (ohne EGF, nur 5% fötales Kälberserum). Anschließend wurde ihnen für vier Tage Induktionsmedium (Hungermedium, mit Prolaktin (5 µg/ml) und Dexamethason (0,1 µM) angereichert) gegeben. Die Expression des Reportergens in Abhängigkeit des verwendeten Expressionskonstruktes und des Mediums wird in Fig. 6B dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß

- das als PIII bezeichnete Genomfragment ein Promotor ist, weil seine Verwendung als Promotor die Bildung des Reporter-Enzymes in Milchdrüsenepithelzellen antreibt;
- das Laktationshormon Prolaktin die Aktivität dieses Promotors in diesen Milchdrüsenepithelzellen reguliert; und
- eine Deletion des 5'-Bereiches (bis zu der MstII Restriktionsschnittstelle) zu einem massiven Verlust der Promotoraktivität führt, was von einem Verlust der regulierenden Wirkung des Prolaktins begleitet ist.

Zur Einordnung und zum Vergleich der Ergebnisse der in Fig. 6B dargestellten Ergebnisse wurden diese Reporter-gen-Konstrukte auch transient in verschiedenen anderen Zellen geprüft und mit Reporter-gen-Konstrukten verglichen, die von PI angetrieben wurden. Es zeigte sich, daß

- PIII (Klon 397) in humanen Milchdrüsenepithelzellen (MCF7) etwa die 10-fache Stärke eines 2.9 kbp großen PI Promotorstückes hat (PIII Expression 25-fach über der des leeren Vektors pGL3-Basic, in diesem Vergleich);
- PIII in humanen Leberzellen (HepRI) ebenfalls etwa die 10-fache Stärke von PI aufweist, in diesen Zellen – im Gegensatz zu den Milchdrüsenepithelzellen – jedoch:
  - (i) weder eine Prolaktinwirkung nachweisbar ist und
  - (ii) die Deletion des 5'-gelegenen Promotorbereiches (bis zur MstII Schnittstelle, was die STAT5-Bindungsstelle einschließt) zu einer Steigerung der Expression führt (1,5-fach gegenüber dem langen Promotorfragment).

Auch die Beobachtung, daß die Deletion der STATS Ansatzstelle in Leberzellen zu einer Steigerung der Expression des Reporter-gen-Konstruktes führt, bestätigt daß STATS, je nach Promotortyp, auch als Repressor der Transkription wirken kann (vgl. auch Luo, G. & Yu-Lee, L.-Y., J. Biol.Chem. Vol. 272 (1997), 26841–26849). Somit konnte gezeigt werden, daß in unterschiedlichen Zelltypen die gleiche STATS Bindungsstelle in Abhängigkeit von dem übrigen, zelltyp-spezifischen Besatz des Promotors mit anderen Transkriptionsfaktoren unterschiedlich wirken kann.

#### Beispiel 5

##### Nachweis der Gewebespezifität des Promotors

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Aktivierung von PIII wurde RNA von unterschiedlichen Geweben des Rindes isoliert und in RT-PCR Experimenten vergleichend Accα Transkripte von zwei verschiedenen Promotoren, PII und PIII, dargestellt (Fig. 8).

Zunächst wird die genomische Anordnung der unterschiedlichen Promotoren der Accα anhand von Fig. 7 erläutert. Der Leberspezifische Promotor PI liegt am weitesten im 5'-Bereich. (d. h. am "Genanfang"). Die Aktivität dieses Promotors wird stark in Abhängigkeit von der Stoffwechseltage des Tieres reguliert.

In etwa 11 kbp Abstand findet sich beim Rind der konstitutiv exprimierte PII. Es besteht gegenwärtig noch eine gewisse Unsicherheit bezüglich der genauen Anordnung und Sequenz. Bisher wurde beim Rind sicher Exon 3 identifiziert, kloniert und sequenziert. Es umfaßt 47 bp. Im 5'angrenzenden Bereich von Exon 3 in etwa 1 kbp Entfernung befindet sich ein Sequenzmotiv von 6 bp, welches in 5 unterschiedlichen 5'-RACE Klonen der bovinen Accα als 5'-terminale cDNA Basen gefunden wurden, die mit einem nach 5'-gerichteten Oligonukleotid angeprimt wurden, dessen Sequenz von Exon 3 abgeleitet worden war. Es ist anzunehmen, daß diese 6 bp von dem vermutlich sehr kurzen Exon 2 herrühren. Jedoch ist ein Sequenzmotiv von sechs bp kein ausreichender Nachweis für ein Exon. Um diese Unsicherheit darzulegen, wird Exon 2 in Fig. 7 besonders gekennzeichnet (\*) und der Abstand zu Exon 3 als nicht gesichert bezeichnet. Aus dieser Unsicherheit heraus wurde dem von Exon 3 abgeleitete Oligonukleotid die Laborbezeichnung bAc\_xf (5'-TCCTCGGAGATGCTTAGTGAC) gegeben, dessen Bezeichnung der Nachvollziehbarkeit wegen hier beibehalten wird. Bezüglich der Anordnung und Sequenzen der übrigen Exons bestehen keine Unsicherheiten.

Die Bedeutung des PII und der Darstellung des Exons 3 liegt darin, daß sich der Nachweis der Transkripte, die von diesem konstitutiv aktiven Promotor gebildet werden, als aussagekräftige positiv-Kontrollen zum Nachweis von Accα-Transkripten eignen.

Für das in Fig. 8 dargestellte Experiment wurde RNA aus 8 unterschiedlichen Geweben entnommen und jeweils eine einzelsträngige Accα cDNA mit dem Primer bAc\_Ex6m erzeugt. Von diesen Proben wurden jeweils zwei identische PCR-Ansätze erstellt, wobei zur PCR Amplifikation entweder der nach 3'gerichteten Primer bAc\_5Af2 (Fig. 8) oder der von Exon 3 abgeleiteten Primer bAc\_xf verwendet wurde. PCR-Produkte wurden mit dem "Touch-down" Standardprogramm erzeugt und Gel-elektrophoretisch aufgetrennt.

Die in Fig. 8 verwendeten Abkürzungen weisen auf die folgenden Gewebe hin, die für die PCR eingesetzt wurden: 1: Leber; 2: Adipose Gewebe; 3: Niere; 4: Gehirn; 5: Muskel; 6: Lunge; 7: Mischdrüse, nichtlaktierend; 8: laktierende Milchdrüse; K: PCR Kontrolle (identischer Ansatz ohne RNA).

Im Ergebnis zeigt sich:

1. Der Promotor PIII treibt die Bildung eines einheitlichen Transkripts an, während von PII 2 Typen von Transkripten gebildet werden. Klonierung und Sequenzierung zeigte, daß sich diese beiden Transkripte durch Gegenwart oder Abwesenheit von Exon 4 unterscheiden. Die durch Sequenzierung gefundene Exon-Zusammensetzung der Transkripte ist angegeben.
2. Die PIII-Aktivität ist gewebespezifisch. Keine Transkripte finden sich in Gehirn und Muskel. Bedingt durch die Durchführung der Experimente mittels RT-PCR lassen die in Fig. 8 dargestellten Experimente keine Aussage über unterschiedliche Transkriptmengen zu. Sofern auch nur Spuren von Transkriptmengen vorhanden sind, werden sie mit dieser Technik und unter den gewählten Bedingungen als kräftige Bande in der Gelelektrophorese dargestellt.
3. In allen Geweben wird durch die Aktivität des Promotors PII Acc $\alpha$  gebildet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden von der Ratte.

Diese Ergebnisse belegen, daß die Aktivität des PIII Promotors ganz oder teilweise gehemmt werden kann, ohne daß solche Tiere dadurch lebensunfähig werden, weil diese aufgrund der Aktivität von PII zur Acc $\alpha$  Bildung befähigt sind. Die lebensnotwendige Grundausstattung der Zellen mit diesem Enzyme ist somit gewährleistet.

## Beispiel 6

### Einsatz des TG18-Mikrosatelliten im Bereich des PIII zur Genotypisierung

Der in der Sequenz des PIII im Beispiel 3 (Fig. 1; SEQ ID NO: 1) identifizierte Mikrosatellit ist polymorph und kann daher zur Genotypisierung eingesetzt werden.

Die DNA von acht Zuchtbullen wurde mit den Primern AccMSP3f und AccMSP3r in PCR Reaktionen amplifiziert. Dabei zeigten sich wenigstens drei unterschiedliche Allele (vgl. Fig. 9).

Basierend auf der in Beispiel 3 gezeigten DNA-Sequenz des PIII-Promotors lassen sich somit Oligonukleotidprimer ableiten, durch deren Einsatz allelische Varianten von PIII in der Zuchtpopulation von Rindern nachgewiesen werden können. Durch Korrelation verschiedener Allele mit Leistungsparametern im Milchfettgehalt können natürlich vorkommende Leistungsvarianten des Promotors aufgedeckt und züchterisch nutzbar gemacht werden.

# DE 199 46 173 A 1

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungsanstalt für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere

<120> Expression der bovinen Acetyl-Coenzym A Carboxylas

<130> P50515

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 3690

<212> DNA

<213> Rind

<220>

<221> satellite

<222> (933)..(966)

<220>

<221> protein\_bind

<222> (2188)..(2219)

<220>

<221> exon

<222> (3055)..(3495)

<223> Exon 5A

<400> 1

gatatcatcc catttatata tccagaacag gcaaatctat aaagacagaa agtagattag 60

tcattgctta ggactgggga gtggtttgag ggaaatatgg actgactgct gccgagtaca 120

gggtttcttt ggcggtgct gaaaatgttc caaatggac ttgtgatgat gggtcgcaac 180

tctgtgactg taaggaaaac cattgaatta tatactgtaa atggccaaa tatatggtat 240

gtgaattctg tctcaataaa gttaaggatt tttaaatgg gtgtatgatc catacacaaa 300

aattagttgc atttctatgt actagctagc aatgagcaag caaaaaaaaa aaaaaaactt 360

aaataatttt attcagaatg gcatcaaaaa gaataaata cttaggaatc aattgaacaa 420

aaaagcataa gacttgatca ttaaaattgt tacattgctg agagaaatta aagtctgctg 480

ctactgcggt ttagtcaatt aagtcatatc tgattctttc tcagccccgt ggactgtagc 540

ccaccaggct cctctgtccg tgggatttcc caggcaagaa cactgcagtg agttgccatt 600

tccttctcca ggggatcttt ccaaccagg aactgaacct atgtctcctg cttggcaggt 660

gaattcttta ccccgagtcc tctgccttgc aagggtgatg cttaaccact agagcaccag 720

ggaagttcca cagctaaacc tttttatata taaaagggtt gatcctcttc ttcttcttct 780

tttttttttt tccaatatt catttatctg gctttgcatc ttagttgtgg tatgtgtggt 840

cttccatcat cattgctggg ctctttggtt gcaacatgcg aatttttagc tgtggtgtgt 900

# DE 199 46 173 A 1

gagatctagt accctagtat gtgtgtgttt ttgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 960  
 gtgtgtgctt tttgtgtcag actctttgtg accacctgga ctgtagtcca tcaggctcct 1020  
 ttgtcagtgg aatttcccag gcgagaatac cggagtgggt tgccatttcc tagttccctg 1080 5  
 accaaggatc aaaccagcc gcacctccc caccctcgcc ccccaggtt gggagtgtag 1140  
 agtctcagcc cctggagcag gaggggaagtc cctaacagca gactgatttt ccaaagaggt 1200 10  
 acatccctga tgcaagattt ctttgcttgg gaaagcccca gcgtaaaaac actgtctccc 1260  
 agcgtgtgct gcagtataac tcagactgcc ttgcaacgga gccagctaaa tgcactactg 1320  
 tctgccggat aaactgctac gtcactcctt gtgcttggca tgtttcaatg ctgggggtcag 1380 15  
 tgtgggcttc tagttggatt tgggtgccagg tatgtgtcta ctttgacac tctcttttca 1440  
 tgtagatta aaaatgaggg tgccctgaat ttggaggaac gaatgtgcga atgtggcctt 1500  
 ttatttcttg tgttctcaca ttataggaag atgggtggga gcatccgtaa aagatgagaa 1560 20  
 aactagctt tgttttgag ctgggtgtgc cctgttagcg tttggttgtt ttagaaagat 1620  
 ccttttggtg aagggaagca caagcttgat tcccgagagt gcctcttttag tatatttttt 1680 25  
 tatataatca agagcaaaat aacctgcttt ttttctatat gccattcttt gctttttgaa 1740  
 tgttgaactt aacaaaggca gagagtgatt ctcttctgga aagtcctga tctagagacc 1800  
 cttagatgtg tgtaaaaatt aagctgcttc tacatctgtg gtcaccgtaa ttgttctgaa 1860 30  
 ccaaaggctt cagtgtcttt ttttttgaga cttgttatcc tgaagagaga tcaagatagg 1920  
 aggattcctc tgcatctgct tctttaaaagg aaaaagtaaa ctttactgac tttatcagac 1980  
 gttagcacag tgtaaaagga gtgatgcaga gttcggaac caatccagga ctctctcttt 2040 35  
 ttttttatta tgactaatgg tcatattgag tgagtggcct gattgagtct tttcaccttg 2100  
 ggtcacctga atgtcctaac atcaagggtt atcttaataa tttatcttct atttgatttt 2160 40  
 tatctgtgtt ccagatcatt tgtgtacttc tgttttgaag ggttttcgtg gaatgttaat 2220  
 agattcgcgg catagtgtga tcagataaga gtaaccatt tgtattcaac atttcggtga 2280  
 gaagggaattt ttctgtggtg cctgaatcag gttagatgtg actctggtga attaatacca 2340 45  
 ttcttgagga cttggctcag gaaatcatga tcttttctgc catgacaagg gagcagtatt 2400  
 ttcagcatct acttaattaa aagctaaaac aggataccat ttccttttca gtcaccattt 2460  
 ctttatttaa gtggcttatc gctctgtggc aaatgagcat aacaatagat gtgtccccgt 2520 50  
 ggcttttagg cagggttttt cttccctgct taaacgccgg gttagacctg tgtctaaaat 2580  
 acttgtctgg gcccttttac gtttctgtga cttttatcca catctctctt gttatcctgt 2640 55  
 ttgtgccagc tccagtctta ttctcaaatt ttagtgaata agatcttaga tttttgttgt 2700  
 ttttaaaaaa ggtgtgtgta caccactact ctggccttaa aattagagtt gtgaccccca 2760  
 ctttattcca agttcctcag tgggtggcgtg tctcgtcctt ctgaccggct tgctttccct 2820 60

65

# DE 199 46 173 A 1

cttgacctgc tctccccccg tcttgaggatc tgaaactcag tcttacttgt tgtgattggg 2880  
 tctcagaaat cacctgttct ttcctcctcc ctctagattt cctgacccca ttattttctg 2940  
 5 ggcatagctg tcctcataag cttgggtcttc tctttttgcc ctgagccttc cctgtcacgt 3000  
 gcccttgga gacctggagag gccgcggagc ctctctagt accgtcagaa gaaa gtg 3057  
 acc gtt gtt aaa gca ctt ttg ctg cag cta agg cgg aag ctg ctg aga 3105  
 10 tct act tta gag tta tac ctg ctt cta tat ttc tcc ccc tct ctt ctc 3153  
 tgt ccc ctt ggg aaa tca gct gat gct gtg tgg gag ccc agt gta atg 3201  
 15 ggg ggg ggg gca aac agg agg gga agt atg gag att ggg gac aga gta 3249  
 gac aaa aag act gtg gtt tga ggc cat gag gag tac tct act ctg act 3297  
 gaa gca ggt cca aga agt agg cag aag gca cag tat ctt ttg tcc tcc 3345  
 20 tgg gtt tta agc acc tgc agc ggg agg acg aac tcc agc ttg tgt tta 3393  
 caa ggc cga cag ctg aag aga aaa acc tct att cct ttg cca tct tga 3441  
 tat gga ggg ttc tgc gga gga gag taa gga aat gag ata tta cat gct 3489  
 25 tca aag gtaagtgtta gagggcccta tctaggcaat atatgccttt taaaagcagt 3545  
 aaaggcgttg acagctaagc cctggaatta tgggcagtct gatttgatga tttttttgtg 3605  
 30 ggtctgtagg aaactctttt ttttcttaag gaatgaatta aatctatgtt gctcctgatt 3665  
 ctgaccttat tttcctcaga ttgac 3690

35

<210> 2  
 <211> 7255  
 <212> DNA  
 <213> Rind

40

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (389)..(7255)

45

<400> 2  
 gtgaccgttg ttaaagcact tttgctgcag ctaaggcgga agctgctgag atctacttta 60  
 gagttataacc tgcttctata tttctcccc tctcttctct gtccccttgg gaaatcagct 120  
 gatgctgtgt gggagcccag tgtaatggga gggggggcaa acaggagggg aagtatggag 180  
 50 attggggaca gagtagacaa aaagactgtg gtttgaggcc atgaggagta ctctactctg 240  
 actgaagcag gtccaagaag taggcagaag gcacagtatc ttttgcctc ctgggtttta 300  
 55 agcacctgca gcgggaggac gaactccagc ttgtgtttac aaggccgaca gctgaagaga 360  
 aaaacctcta ttcctttgcc atcttgat atg gag ggt tct gcg gag gag agt 412  
 Met Glu Gly Ser Ala Glu Glu Ser  
 1 5

60

aag gaa atg aga tat tac atg ctt caa aga tcc agc atg tct ggc ttg 460

65

# DE 199 46 173 A 1

Lys	Glu	Met	Arg	Tyr	Tyr	Met	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Met	Ser	Gly	Leu		
10						15					20						
cac	cta	gtc	aag	caa	ggc	cga	gac	cga	aag	aaa	ata	gac	tca	cag	cga	508	5
His	Leu	Val	Lys	Gln	Gly	Arg	Asp	Arg	Lys	Lys	Ile	Asp	Ser	Gln	Arg		
25					30					35					40		
gat	ttc	act	gta	gcc	tct	cca	gca	gaa	ttt	gtt	act	cgt	ttt	ggc	ggg	556	
Asp	Phe	Thr	Val	Ala	Ser	Pro	Ala	Glu	Phe	Val	Thr	Arg	Phe	Gly	Gly		10
				45					50					55			
aat	aaa	gtg	att	gag	aag	gtt	ctc	att	gcc	aac	aat	ggc	att	gca	gct	604	
Asn	Lys	Val	Ile	Glu	Lys	Val	Leu	Ile	Ala	Asn	Asn	Gly	Ile	Ala	Ala		
			60					65					70				
gtg	aaa	tgc	atg	aga	tcc	atc	cgc	cgg	tgg	tct	tat	gag	atg	ttt	cga	652	15
Val	Lys	Cys	Met	Arg	Ser	Ile	Arg	Arg	Trp	Ser	Tyr	Glu	Met	Phe	Arg		
		75					80					85					
aat	gaa	cgt	gca	atc	cga	ttt	gtt	gtc	atg	gtc	aca	cct	gaa	gac	ctg	700	20
Asn	Glu	Arg	Ala	Ile	Arg	Phe	Val	Val	Met	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu		
	90					95					100						
aaa	gcc	aat	gca	gaa	tac	att	aag	atg	gcg	gat	cac	tac	gtg	ccc	gtg	748	
Lys	Ala	Asn	Ala	Glu	Tyr	Ile	Lys	Met	Ala	Asp	His	Tyr	Val	Pro	Val		25
105					110					115					120		
cca	gga	ggc	ccc	aac	aac	aac	aac	tat	gca	aat	gtg	gag	tta	att	ctt	796	
Pro	Gly	Gly	Pro	Asn	Asn	Asn	Asn	Tyr	Ala	Asn	Val	Glu	Leu	Ile	Leu		
				125					130					135			
gac	att	gct	aaa	agg	atc	ccc	gtg	caa	gca	gtt	tgg	gct	ggc	tgg	ggc	844	30
Asp	Ile	Ala	Lys	Arg	Ile	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Trp	Ala	Gly	Trp	Gly		
			140					145					150				
cat	gct	tct	gag	aat	ccc	aag	ctc	cca	gaa	ctt	ctc	ttg	aaa	aat	ggc	892	35
His	Ala	Ser	Glu	Asn	Pro	Lys	Leu	Pro	Glu	Leu	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly		
		155					160					165					
atc	gcc	ttc	atg	ggc	cct	cca	agc	caa	gcc	atg	tgg	gct	ctg	ggg	gat	940	
Ile	Ala	Phe	Met	Gly	Pro	Pro	Ser	Gln	Ala	Met	Trp	Ala	Leu	Gly	Asp		40
		170				175					180						
aag	atc	gca	tct	tcc	ata	gtg	gct	caa	act	gct	ggc	atc	cca	act	ctt	988	
Lys	Ile	Ala	Ser	Ser	Ile	Val	Ala	Gln	Thr	Ala	Gly	Ile	Pro	Thr	Leu		
185					190					195					200		
cca	tgg	agt	ggc	agt	ggc	ctt	tgt	gtg	gac	tgg	cac	gaa	aat	gat	ttt	1036	45
Pro	Trp	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Cys	Val	Asp	Trp	His	Glu	Asn	Asp	Phe		
				205					210					215			
tca	aaa	cga	att	tta	aat	gtt	cct	cag	gaa	cta	tat	gaa	aaa	ggc	tat	1084	50
Ser	Lys	Arg	Ile	Leu	Asn	Val	Pro	Gln	Glu	Leu	Tyr	Glu	Lys	Gly	Tyr		
			220					225					230				
gtg	aag	gat	gtg	gat	gat	ggg	ctg	aag	gca	gcg	gag	gaa	gtt	gga	tat	1132	
Val	Lys	Asp	Val	Asp	Asp	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Val	Gly	Tyr		55
		235					240					245					
cca	gta	atg	atc	aag	gcc	tca	gaa	gga	gga	gga	ggg	aag	gga	atc	aga	1180	
Pro	Val	Met	Ile	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Gly	Ile	Arg		
		250				255					260						
aaa	gtc	aac	aat	gca	gat	gac	ttc	cct	aac	ctc	ttc	cga	cag	gtt	caa	1228	60



# DE 199 46 173 A 1

	Lys	Val	Asn	Asn	Ala	Asp	Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Phe	Arg	Gln	Val	Gln	
	265					270					275					280	
5	gct	gaa	gtt	cct	ggg	tct	cct	atc	ttt	gtc	atg	aga	cta	gcc	aaa	cag	1276
	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Ser	Pro	Ile	Phe	Val	Met	Arg	Leu	Ala	Lys	Gln	
					285					290					295		
10	tct	cgt	cat	ctg	gag	gtg	cag	atc	tta	gca	gat	cag	tat	ggc	aat	gct	1324
	Ser	Arg	His	Leu	Glu	Val	Gln	Ile	Leu	Ala	Asp	Gln	Tyr	Gly	Asn	Ala	
				300					305					310			
	atc	tct	ttg	ttt	ggg	cgt	gat	tgc	tct	gtg	caa	cgc	agg	cat	cag	aag	1372
	Ile	Ser	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Arg	His	Gln	Lys	
				315				320					325				
15	att	att	gaa	gaa	gct	cct	gct	gct	att	gct	act	cca	gca	gta	ttt	gaa	1420
	Ile	Ile	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ile	Ala	Thr	Pro	Ala	Val	Phe	Glu	
					330			335				340					
20	cat	atg	gaa	cag	tgt	gcg	gtg	aaa	ctt	gcc	agg	atg	gtt	ggg	tat	gtg	1468
	His	Met	Glu	Gln	Cys	Ala	Val	Lys	Leu	Ala	Arg	Met	Val	Gly	Tyr	Val	
					345			350			355					360	
25	agt	gcg	ggg	act	gtg	gaa	tac	ctc	tac	agc	cag	gat	ggc	agc	ttc	tac	1516
	Ser	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	Phe	Tyr	
					365					370					375		
	ttt	ctg	gaa	ctg	aac	cct	cgg	cta	cag	gtg	gag	cac	ccc	tgt	aca	gag	1564
	Phe	Leu	Glu	Leu	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Val	Glu	His	Pro	Cys	Thr	Glu	
					380				385					390			
30	atg	gtg	gcc	gat	gtc	aac	ctc	cct	gct	gcg	cag	ctc	cag	att	gcc	atg	1612
	Met	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Leu	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Gln	Ile	Ala	Met	
					395			400					405				
35	ggg	atc	cct	ctg	tac	aga	atc	aag	gat	atc	cga	atg	atg	tac	ggg	gtc	1660
	Gly	Ile	Pro	Leu	Tyr	Arg	Ile	Lys	Asp	Ile	Arg	Met	Met	Tyr	Gly	Val	
					410			415				420					
40	tct	ccc	tgg	ggc	gat	gct	ccc	att	gat	ttt	gaa	aat	tcg	gct	cac	gtt	1708
	Ser	Pro	Trp	Gly	Asp	Ala	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Asn	Ser	Ala	His	Val	
					425			430			435					440	
	cct	tgc	cca	agg	ggc	cat	gtt	att	gct	gct	cgt	atc	act	agt	gaa	aat	1756
	Pro	Cys	Pro	Arg	Gly	His	Val	Ile	Ala	Ala	Arg	Ile	Thr	Ser	Glu	Asn	
					445					450					455		
45	cca	gat	gag	ggg	ttt	aag	ccc	agc	tca	gga	aca	gtt	caa	gag	ctg	aat	1804
	Pro	Asp	Glu	Gly	Phe	Lys	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr	Val	Gln	Glu	Leu	Asn	
					460			465						470			
50	ttt	cgc	agc	aat	aag	aac	gtt	tgg	ggg	tat	ttc	agt	gtt	gct	gct	gca	1852
	Phe	Arg	Ser	Asn	Lys	Asn	Val	Trp	Gly	Tyr	Phe	Ser	Val	Ala	Ala	Ala	
					475			480					485				
55	gga	ggg	ctt	cat	gaa	ttt	gct	gat	tct	cag	ttt	ggg	cac	tgc	ttt	tcc	1900
	Gly	Gly	Leu	His	Glu	Phe	Ala	Asp	Ser	Gln	Phe	Gly	His	Cys	Phe	Ser	
					490			495				500					
	tgg	gga	gaa	aac	cga	gag	gaa	gca	att	tca	aac	atg	gtt	gtg	gct	ttg	1948
	Trp	Gly	Glu	Asn	Arg	Glu	Glu	Ala	Ile	Ser	Asn	Met	Val	Val	Ala	Leu	
					505			510			515					520	
60	aag	gag	ctg	tct	atc	cgg	ggc	gac	ttc	cgg	acc	aca	gtc	gag	tac	ctg	1996

65

# DE 199 46 173 A 1

Lys	Glu	Leu	Ser	Ile	Arg	Gly	Asp	Phe	Arg	Thr	Thr	Val	Glu	Tyr	L u		
				525					530					535			
atc	aaa	ctg	ctg	gag	act	gaa	agc	ttt	cag	ttg	aac	aga	att	ggc	acg	2044	5
Ile	Lys	Leu	Leu	Glu	Thr	Glu	Ser	Phe	Gln	L u	Asn	Arg	Ile	Gly	Thr		
			540					545					550				
ggc	tgg	ctg	gac	aga	ctg	ata	gca	gaa	aaa	gta	cag	gcg	gag	cga	cct	2092	10
Gly	Trp	Leu	Asp	Arg	Leu	Ile	Ala	Glu	Lys	Val	Gln	Ala	Glu	Arg	Pro		
			555				560					565					
gac	acc	atg	ctg	gga	gtt	gtc	tgt	ggg	gct	ctc	cat	gtg	gca	gac	gtg	2140	15
Asp	Thr	Met	Leu	Gly	Val	Val	Cys	Gly	Ala	Leu	His	Val	Ala	Asp	Val		
			570			575					580						
agc	ctg	cgg	aat	agc	atc	tcc	aac	ttc	ctt	cac	tcc	tta	gag	agg	ggc	2188	20
Ser	Leu	Arg	Asn	Ser	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	His	Ser	Leu	Glu	Arg	Gly		
					590					595					600		
caa	gtc	ctc	act	gct	cat	acc	ctt	ctg	aat	aca	gta	gat	gtt	gaa	ctt	2236	25
Gln	Val	Leu	Thr	Ala	His	Thr	Leu	Leu	Asn	Thr	Val	Asp	Val	Glu	Leu		
				605					610					615			
atc	tac	gag	gga	gtg	aag	tat	gta	ctg	aag	gtg	act	cga	cag	tcc	ccg	2284	30
Ile	Tyr	Glu	Gly	Val	Lys	Tyr	Val	Leu	Lys	Val	Thr	Arg	Gln	Ser	Pro		
			620					625					630				
aac	tcc	tac	gtg	gtg	atc	atg	aac	ggc	tcg	tgt	gtg	gaa	gta	gac	gtg	2332	35
Asn	Ser	Tyr	Val	Val	Ile	Met	Asn	Gly	Ser	Cys	Val	Glu	Val	Asp	Val		
			635				640					645					
cat	cga	ctg	agc	gac	ggc	gga	ctg	ctc	ttg	tcc	tat	gac	gtc	agc	agt	2380	40
His	Arg	Leu	Ser	Asp	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Ser	Tyr	Asp	Val	Ser	Ser		
			650			655					660						
tac	acc	acg	tac	atg	aag	gag	gag	gtg	gat	aga	tat	cgc	atc	aca	att	2428	45
Tyr	Thr	Thr	Tyr	Met	Lys	Glu	Glu	Val	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ile	Thr	Ile		
				670					675					680			
ggc	aat	aaa	act	tgt	gtg	ttt	gag	aag	gaa	aat	gac	cct	tcg	gtg	ctg	2476	50
Gly	Asn	Lys	Thr	Cys	Val	Phe	Glu	Lys	Glu	Asn	Asp	Pro	Ser	Val	Leu		
				685					690					695			
cgc	tca	ccc	tct	gct	ggg	aag	ttg	atc	cag	tac	att	gtg	gag	gat	gga	2524	55
Arg	Ser	Pro	Ser	Ala	Gly	Lys	Leu	Ile	Gln	Tyr	Ile	Val	Glu	Asp	Gly		
			700					705					710				
ggc	cac	gtg	ttt	gct	ggc	cag	tgc	tat	gcc	gag	atc	gag	gtg	atg	aag	2572	60
Gly	His	Val	Phe	Ala	Gly	Gln	Cys	Tyr	Ala	Glu	Ile	Glu	Val	Met	Lys		
			715			720						725					
atg	gta	atg	acc	tta	aca	gcc	gca	gag	tct	ggc	tgt	atc	cat	tat	gtc	2620	65
Met	Val	Met	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Cys	Ile	His	Tyr	Val		
			730			735					740						
aag	cgg	cct	gga	gca	gct	ctt	gac	ccg	ggc	tgt	gta	ata	gcc	aaa	atg	2668	70
Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	Ala	Leu	Asp	Pro	Gly	Cys	Val	Ile	Ala	Lys	Met		
					750					755					760		
caa	ctg	gac	aac	ccc	agc	aag	gtc	cag	cag	gct	gag	ctt	cac	aca	ggc	2716	75
Gln	Leu	Asp	Asn	Pro	Ser	Lys	Val	Gln	Gln	Ala	Glu	Leu	His	Thr	Gly		
				765					770					775			
agt	ctg	cca	cgg	atc	cag	agc	aca	gcg	ctc	aga	ggc	gag	aag	ctc	cac	2764	80

# DE 199 46 173 A 1

	Ser	Leu	Pro	Arg	Ile	Gln	Ser	Thr	Ala	L	u	Arg	Gly	Glu	Lys	Leu	His	
	780								785						790			
5	cga	gtg	ttc	cac	tat	gtc	ctg	gat	aat	ctg	gtc	aat	gtg	atg	aat	gga		2812
	Arg	Val	Ph	His	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Val	Met	Asn	Gly		
			795					800					805					
10	tac	tgc	ctt	cca	gat	cct	ttc	ttt	agc	agc	agg	gtg	aaa	gac	tgg	gtt		2860
	Tyr	Cys	Leu	Pro	Asp	Pro	Phe	Phe	Ser	Ser	Arg	Val	Lys	Asp	Trp	Val		
		810					815					820						
15	gaa	cgg	ttg	atg	aag	acc	ctc	aga	gac	ccc	tcc	ttg	cct	ctc	cta	gaa		2908
	Glu	Arg	Leu	Met	Lys	Thr	Leu	Arg	Asp	Pro	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu		
	825					830					835					840		
20	ttg	cag	gat	atc	atg	act	agc	gtc	tct	ggc	cgt	atc	ccg	ccc	aac	gtg		2956
	Leu	Gln	Asp	Ile	Met	Thr	Ser	Val	Ser	Gly	Arg	Ile	Pro	Pro	Asn	Val		
					845					850					855			
25	gaa	aag	tct	atc	aag	aag	gaa	atg	gct	cag	tat	gcc	agc	aac	atc	aca		3004
	Glu	Lys	Ser	Ile	Lys	Lys	Glu	Met	Ala	Gln	Tyr	Ala	Ser	Asn	Ile	Thr		
				860					865					870				
30	tcc	gtg	ctc	tgt	cag	ttt	ccc	agc	cag	cag	att	gcc	aac	atc	cta	gac		3052
	Ser	Val	Leu	Cys	Gln	Phe	Pro	Ser	Gln	Gln	Ile	Ala	Asn	Ile	Leu	Asp		
			875				880					885						
35	agc	cac	gca	gcc	aca	ctg	aac	cgg	aaa	tct	gaa	cgg	gaa	gtc	ttc	ttc		3100
	Ser	His	Ala	Ala	Thr	Leu	Asn	Arg	Lys	Ser	Glu	Arg	Glu	Val	Phe	Phe		
		890					895					900						
40	atg	aac	act	cag	agc	atc	gtc	cag	ctg	gtg	cag	agg	tac	cgc	agt	ggc		3148
	Met	Asn	Thr	Gln	Ser	Ile	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Arg	Tyr	Arg	Ser	Gly		
	905					910					915					920		
45	atc	cga	gga	cac	atg	aag	gct	gtg	gtg	atg	gac	ctg	ctg	cgg	cag	tac		3196
	Ile	Arg	Gly	His	Met	Lys	Ala	Val	Val	Met	Asp	Leu	Leu	Arg	Gln	Tyr		
					925					930					935			
50	ctg	cga	gta	gag	aca	caa	ttc	cag	aac	ggc	cac	tat	gac	aaa	tgc	gtg		3244
	Leu	Arg	Val	Glu	Thr	Gln	Phe	Gln	Asn	Gly	His	Tyr	Asp	Lys	Cys	Val		
			940						945					950				
55	ttc	gcc	ctc	cgg	gag	gag	aac	aag	agt	gat	atg	aac	act	gtg	ctg	aac		3292
	Phe	Ala	Leu	Arg	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Asp	Met	Asn	Thr	Val	Leu	Asn		
			955					960					965					
60	tac	atc	ttc	tct	cat	gct	cag	gtc	acc	agg	aag	aat	ctt	ctg	gtc	acc		3340
	Tyr	Ile	Phe	Ser	His	Ala	Gln	Val	Thr	Arg	Lys	Asn	Leu	Leu	Val	Thr		
		970				975						980						
65	atg	ctt	atc	gat	cag	ctg	tgt	ggc	cgg	ggc	ccc	acc	ctc	act	gat	gag		3388
	Met	Leu	Ile	Asp	Gln	Leu	Cys	Gly	Arg	Gly	Pro	Thr	Leu	Thr	Asp	Glu		
	985					990					995					1000		
70	ctg	ctg	aat	atc	ctc	acg	gag	cta	act	caa	ctc	agc	aag	acc	acc	aac		3436
	Leu	Leu	Asn	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Gln	Leu	Ser	Lys	Thr	Thr	Asn		
					1005					1010					1015			
75	gcg	aag	gtg	gcg	ctc	cga	gca	cgc	cag	gtt	ctt	att	gct	tcc	cat	ttg		3484
	Ala	Lys	Val	Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	Gln	Val	Leu	Ile	Ala	Ser	His	Leu		
			1020					1025					1030					
80	cca	tcc	tat	gag	ctt	cgc	ctc	aac	caa	gtc	gag	tct	atc	ttc	cta	tcc		3532

65

# DE 199 46 173 A 1

Pro Ser Tyr Glu Leu Arg L u Asn Gln Val Glu Ser Ile Phe Leu Ser		
1035	1040	1045
gcc att gac atg tat gga cac cag ttc tgc atc gag aac ctg cag aaa	3580	5
Ala Ile Asp Met Tyr Gly His Gln Phe Cys Ile Glu Asn Leu Gln Lys		
1050	1055	1060
ctc atc ttg tcc gaa acg tgc att ttt gat gtc cta cca aac ttc ttc	3628	
Leu Ile Leu Ser Glu Thr Ser Ile Phe Asp Val Leu Pro Asn Phe Phe		10
1065	1070	1075
tat cac agc aac cag gtc gtg agg atg gca gct ctg gag gtg tat gtt	3676	
Tyr His Ser Asn Gln Val Val Arg Met Ala Ala Leu Glu Val Tyr Val		
1085	1090	1095
cga agg gct tat atc gcc tat gaa ctt aat agc gta caa cac cgg cag	3724	15
Arg Arg Ala Tyr Ile Ala Tyr Glu Leu Asn Ser Val Gln His Arg Gln		
1100	1105	1110
ctg aag gac aac acc tgc gtg gtg gaa ttc cag ttc atg ctg ccc aca	3772	20
Leu Lys Asp Asn Thr Cys Val Val Glu Phe Gln Phe Met Leu Pro Thr		
1115	1120	1125
tgc cat cca aat aga ggg aac atc ccc acg cta aac aga atg tcc ttc	3820	
Ser His Pro Asn Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Asn Arg Met Ser Phe		25
1130	1135	1140
tcc tcc aac ctc aac cac tac ggc atg act cac gta gcc agt gtc agc	3868	
Ser Ser Asn Leu Asn His Tyr Gly Met Thr His Val Ala Ser Val Ser		
1145	1150	1155
gac gtg ctg ctg gac aac gcg ttc act ccg ccg tgt cag cgg atg ggc	3916	30
Asp Val Leu Leu Asp Asn Ala Phe Thr Pro Pro Cys Gln Arg Met Gly		
1165	1170	1175
ggg atg gtc tct ttt cgg acc ttt gaa gat ttt gtc agg atc ttt gat	3964	35
Gly Met Val Ser Phe Arg Thr Phe Glu Asp Phe Val Arg Ile Phe Asp		
1180	1185	1190
gaa gtg atg ggc tgc ttc tgt gat tcc cca ccc caa agc ccg aca ttc	4012	
Glu Val Met Gly Cys Phe Cys Asp Ser Pro Pro Gln Ser Pro Thr Phe		40
1195	1200	1205
cct gag gca ggt cac acg tct ctg tat gac gaa gac aag gtc ccc agg	4060	
Pro Glu Ala Gly His Thr Ser Leu Tyr Asp Glu Asp Lys Val Pro Arg		
1210	1215	1220
gat gaa cca att cac att ttg aat gtg gct atc aaa aca gac tgt gac	4108	45
Asp Glu Pro Ile His Ile Leu Asn Val Ala Ile Lys Thr Asp Cys Asp		
1225	1230	1235
atc gag gat gac agt cta gca gct atg ttc cga gag ttt acc cag caa	4156	50
Ile Glu Asp Asp Ser Leu Ala Ala Met Phe Arg Glu Phe Thr Gln Gln		
1245	1250	1255
aac aaa gct acc ctg gtt gaa cat ggg atc cga cgc ctt act ttc ctg	4204	
Asn Lys Ala Thr Leu Val Glu His Gly Ile Arg Arg Leu Thr Phe Leu		55
1260	1265	1270
gtt gca caa aag gat ttc agg aaa caa gtc aac tat gaa gtg gat cag	4252	
Val Ala Gln Lys Asp Phe Arg Lys Gln Val Asn Tyr Glu Val Asp Gln		
1275	1280	1285
aga ttt cat aga gaa ttt cct aaa ttt ttc acg ttc cga gca agg gat	4300	60

65

# DE 199 46 173 A 1

	Arg	Phe	His	Arg	Glu	Phe	Pr	Lys	Phe	Phe	Thr	Phe	Arg	Ala	Arg	Asp	
	1290						1295					1300					
5	aag	ttt	gag	gaa	gat	cgt	atc	tat	cgt	cac	ctg	gag	cct	gcc	cta	gct	4348
	Lys	Phe	Glu	Glu	Asp	Arg	Ile	Tyr	Arg	His	Leu	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	
	1305					1310					1315					1320	
10	ttc	cag	tta	gag	ctg	aac	cgg	atg	aga	aat	ttt	gac	ctt	act	gcc	atc	4396
	Phe	Gln	Leu	Glu	Leu	Asn	Arg	Met	Arg	Asn	Phe	Asp	Leu	Thr	Ala	Ile	
						1325					1330				1335		
	ccg	tgt	gcc	aat	cac	aag	atg	cac	ttg	tat	ctt	ggg	gca	gcc	aag	gta	4444
	Pro	Cys	Ala	Asn	His	Lys	Met	His	Leu	Tyr	Leu	Gly	Ala	Ala	Lys	Val	
						1340					1345				1350		
15	gaa	gtg	ggc	aca	gaa	gtg	aca	gac	tac	agg	ttc	ttt	gtt	cgt	gca	atc	4492
	Glu	Val	Gly	Thr	Glu	Val	Thr	Asp	Tyr	Arg	Phe	Phe	Val	Arg	Ala	Ile	
						1355									1365		
20	atc	agg	cat	tct	gat	ctg	gtc	acc	aag	gaa	gct	tcc	ttt	gaa	tat	cta	4540
	Ile	Arg	His	Ser	Asp	Leu	Val	Thr	Lys	Glu	Ala	Ser	Phe	Glu	Tyr	Leu	
						1370										1380	
25	caa	aat	gaa	ggg	gag	cgg	ctc	ctc	ctg	gaa	gcc	atg	gat	gag	ttg	gaa	4588
	Gln	Asn	Glu	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Met	Asp	Glu	Leu	Glu	
						1385						1395				1400	
	gtc	gcc	ttt	aac	aat	aca	aat	gtc	cgg	act	gac	tgc	aac	cac	atc	ttc	4636
	Val	Ala	Phe	Asn	Asn	Thr	Asn	Val	Arg	Thr	Asp	Cys	Asn	His	Ile	Phe	
						1405					1410				1415		
30	ctc	aac	ttt	gtt	cct	aca	gtc	atc	atg	gac	cca	tcg	aag	att	gag	gaa	4684
	Leu	Asn	Phe	Val	Pro	Thr	Val	Ile	Met	Asp	Pro	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	
						1420									1430		
35	tcc	gtg	cgg	agc	atg	gtg	atg	cgc	tat	gga	agt	cgg	ctg	tgg	aag	ctg	4732
	Ser	Val	Arg	Ser	Met	Val	Met	Arg	Tyr	Gly	Ser	Arg	Leu	Trp	Lys	Leu	
						1435									1445		
40	cgt	gtc	ctc	cag	gca	gaa	ctg	aaa	atc	aac	att	cgc	ctg	aca	cca	act	4780
	Arg	Val	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu	Lys	Ile	Asn	Ile	Arg	Leu	Thr	Pro	Thr	
						1450									1460		
	gga	aaa	gca	att	ccc	atc	cgc	ctc	ttc	ctg	acg	aac	gag	tct	ggc	tat	4828
	Gly	Lys	Ala	Ile	Pro	Ile	Arg	Leu	Phe	Leu	Thr	Asn	Glu	Ser	Gly	Tyr	
						1465									1475	1480	
45	tac	ttg	gac	atc	agc	ctg	tac	aag	gaa	gtg	act	gat	tcc	agg	aca	gca	4876
	Tyr	Leu	Asp	Ile	Ser	Leu	Tyr	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Ser	Arg	Thr	Ala	
						1485									1495		
50	cag	atc	atg	ttt	cag	gca	tat	gga	gac	aaa	cag	gga	cca	tta	cat	gga	4924
	Gln	Ile	Met	Phe	Gln	Ala	Tyr	Gly	Asp	Lys	Gln	Gly	Pro	Leu	His	Gly	
						1500									1510		
55	atg	tta	atc	aac	act	ccg	tac	gtg	acc	aaa	gac	cag	ctt	caa	tcc	aag	4972
	Met	Leu	Ile	Asn	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Lys	
						1515									1525		
	agg	ttc	cag	gca	cag	tcc	tta	ggg	aca	aca	tac	ata	tat	gac	atc	cca	5020
	Arg	Phe	Gln	Ala	Gln	Ser	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Ile	Pro	
						1530									1540		
60	gaa	atg	ttt	cgg	cag	tcc	ctg	atc	aaa	ctc	tgg	gaa	tct	atg	tcc	tcc	5068

# DE 199 46 173 A 1

Glu Met Ph	Arg Gln S r	Leu Ile Lys	Leu Trp Glu	Ser Met Ser	Ser	
1545	1550		1555		1560	
caa gca ttc ctt cca ccg ccc cct ctg cct tca gac ata ctg acg tac						5116
Gln Ala Phe Leu Pro Pro Pro Pro Leu Pro Ser Asp Ile Leu Thr Tyr	1565		1570		1575	5
act gag ctc gtg ttg gat gat caa ggt caa ctg gtt cac atg aac agg						5164
Thr Glu Leu Val Leu Asp Asp Gln Gly Gln Leu Val His Met Asn Arg	1580		1585		1590	10
ctt cca gga gga aat gag att ggc atg gta gct tgg aaa atg acc ctt						5212
Leu Pro Gly Gly Asn Glu Ile Gly Met Val Ala Trp Lys Met Thr Leu	1595		1600		1605	
aaa agt cca gaa tat cca gac ggc cga gat atc att gtt att ggc aat						5260
Lys Ser Pro Glu Tyr Pro Asp Gly Arg Asp Ile Ile Val Ile Gly Asn	1610		1615		1620	15
gac atc act tac cga att ggg tcc ttt gga ccc caa gag gat ttg ctg						5308
Asp Ile Thr Tyr Arg Ile Gly Ser Phe Gly Pro Gln Glu Asp Leu Leu	1625		1630		1640	20
ttt ctc aga gct tct gag ctt gcc agg gca gag ggc atc cca cgc atc						5356
Phe Leu Arg Ala Ser Glu Leu Ala Arg Ala Glu Gly Ile Pro Arg Ile	1645		1650		1655	25
tat gta gca gcc aac agt gga gca aga att gga ctg gca gag gaa att						5404
Tyr Val Ala Ala Asn Ser Gly Ala Arg Ile Gly Leu Ala Glu Glu Ile	1660		1665		1670	
cgt cat atg ttt cac gtg gcc tgg gta gat cct gag gat cct tac aag						5452
Arg His Met Phe His Val Ala Trp Val Asp Pro Glu Asp Pro Tyr Lys	1675		1680		1685	30
gga tac aaa tat tta tat ctg acc cct caa gat tac aag aga gtc agt						5500
Gly Tyr Lys Tyr Leu Tyr Leu Thr Pro Gln Asp Tyr Lys Arg Val Ser	1690		1695		1700	35
gct ctc aac tct gtc cat tgt gaa cat gtg gaa gat gaa gga gaa tcc						5548
Ala Leu Asn Ser Val His Cys Glu His Val Glu Asp Glu Gly Glu Ser	1705		1710		1715	40
agg tac aag atc act gac att att ggg aag gaa gaa gga ctt gga gca						5596
Arg Tyr Lys Ile Thr Asp Ile Ile Gly Lys Glu Glu Gly Leu Gly Ala	1725		1730		1735	
gag aac ctt cga ggg tct gga atg att gct ggg gaa tcc tcg ttg gcc						5644
Glu Asn Leu Arg Gly Ser Gly Met Ile Ala Gly Glu Ser Ser Leu Ala	1740		1745		1750	45
tac gac gag atc atc acc atc agc ctg gtt aca tgc agg gcc att ggg						5692
Tyr Asp Glu Ile Ile Thr Ile Ser Leu Val Thr Cys Arg Ala Ile Gly	1755		1760		1765	50
att ggg gct tac ctc gtc cga ctg gga cag aga acc atc cag gtc gaa						5740
Ile Gly Ala Tyr Leu Val Arg Leu Gly Gln Arg Thr Ile Gln Val Glu	1770		1775		1780	55
aat tct cac tta atc ctg aca gga gct ggg gcc ctc aac aaa gtc ctc						5788
Asn Ser His Leu Ile Leu Thr Gly Ala Gly Ala Leu Asn Lys Val Leu	1785		1790		1800	
ggg agt gaa gta tac acc tcc aac aac cag ctg ggg ggc atc cag atc						5836

# DE 199 46 173 A 1

	Gly	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Ser	Asn	Asn	Gln	Leu	Gly	Gly	Il	Gln	Ile	
					1805					1810					1815		
5	atg	cac	aac	aat	ggg	gtg	acg	cac	agc	acc	gtc	tgt	gac	gac	ttc	gag	5884
	Met	His	Asn	Asn	Gly	Val	Thr	His	S r	Thr	Val	Cys	Asp	Asp	Phe	Glu	
				1820					1825					1830			
10	ggg	gtg	ttc	acc	gtc	ctg	cac	tgg	ctg	tct	tac	atg	ccg	aag	agt	gta	5932
	Gly	Val	Phe	Thr	Val	Leu	His	Trp	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Lys	Ser	Val	
			1835					1840					1845				
	tac	agt	tca	ggt	cct	ctc	ctg	aac	tcc	aag	gat	cca	ata	gac	aga	gtc	5980
	Tyr	Ser	Ser	Val	Pro	Leu	Leu	Asn	Ser	Lys	Asp	Pro	Ile	Asp	Arg	Val	
				1850				1855				1860					
15	atc	gag	ttt	gtg	ccc	acg	aag	gcg	ccg	tat	gac	cct	cgg	tgg	atg	ctg	6028
	Ile	Glu	Phe	Val	Pro	Thr	Lys	Ala	Pro	Tyr	Asp	Pro	Arg	Trp	Met	Leu	
				1865			1870				1875					1880	
20	gca	ggc	cgg	cct	cac	cca	acc	cag	aaa	ggt	cag	tgg	ttg	agt	gga	ttt	6076
	Ala	Gly	Arg	Pro	His	Pro	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Trp	Leu	Ser	Gly	Phe	
				1885					1890						1895		
25	ttt	gac	tat	ggc	tct	ttc	tca	gag	atc	atg	caa	ccg	tgg	gca	cag	act	6124
	Phe	Asp	Tyr	Gly	Ser	Phe	Ser	Glu	Ile	Met	Gln	Pro	Trp	Ala	Gln	Thr	
				1900					1905					1910			
	gtg	gtg	ggt	ggc	aga	gcc	agg	cta	gga	gga	ata	ccc	gtg	gga	gta	gtt	6172
	Val	Val	Val	Gly	Arg	Ala	Arg	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Val	Gly	Val	Val	
			1915					1920					1925				
30	gcc	gta	gaa	acc	cga	aca	gtg	gag	ctg	agc	atc	ccg	gct	gat	cct	gca	6220
	Ala	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Val	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Asp	Pro	Ala	
				1930				1935				1940					
35	aac	ctg	gat	tct	gaa	gcc	aag	att	atc	cag	cag	gct	ggc	cag	gtt	tgg	6268
	Asn	Leu	Asp	Ser	Glu	Ala	Lys	Ile	Ile	Gln	Gln	Ala	Gly	Gln	Val	Trp	
				1945			1950				1955					1960	
40	ttc	cca	gac	tcc	gcg	ttt	aag	acg	tat	cag	gcc	att	aag	gac	ttc	aac	6316
	Phe	Pro	Asp	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Tyr	Gln	Ala	Ile	Lys	Asp	Phe	Asn	
				1965					1970					1975			
	cgt	gaa	ggg	ctg	cct	ctg	atg	gtc	ttt	gcc	aac	tgg	aga	ggc	ttc	tcc	6364
	Arg	Glu	Gly	Leu	Pro	Leu	Met	Val	Phe	Ala	Asn	Trp	Arg	Gly	Phe	Ser	
			1980					1985					1990				
45	ggt	ggg	atg	aaa	gat	atg	tac	gac	cag	gtg	ctg	aag	ttc	ggc	gct	tac	6412
	Gly	Gly	Met	Lys	Asp	Met	Tyr	Asp	Gln	Val	Leu	Lys	Phe	Gly	Ala	Tyr	
			1995					2000					2005				
50	atc	gtg	gac	ggc	tta	cgg	gag	tgc	tcg	cag	ccc	gtg	atg	gtc	tac	atc	6460
	Ile	Val	Asp	Gly	Leu	Arg	Glu	Cys	Ser	Gln	Pro	Val	Met	Val	Tyr	Ile	
				2010			2015				2020						
55	ccg	cct	cag	gcc	gag	ctc	cga	ggc	ggc	tcc	tgg	gtg	gtg	att	gac	ccc	6508
	Pro	Pro	Gln	Ala	Glu	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Trp	Val	Val	Ile	Asp	Pro	
			2025			2030				2035					2040		
	acc	atc	aac	ccg	cgg	cac	atg	gag	atg	tat	gcg	gac	cgc	gag	agc	agg	6556
	Thr	Ile	Asn	Pro	Arg	His	Met	Glu	Met	Tyr	Ala	Asp	Arg	Glu	Ser	Arg	
				2045					2050					2055			
60	gga	tcc	ggt	ctg	gag	ccg	gaa	ggg	aca	gtc	gaa	atc	aaa	ttc	cgc	aga	6604

65



# DE 199 46 173 A 1

Gly	Ser	Val	Leu	Glu	Pro	Glu	Gly	Thr	Val	Glu	Ile	Lys	Phe	Arg	Arg		
		2060						2065						2070			
aag	gat	ctg	gtg	aaa	acc	atg	cgt	cgg	gtg	gac	cca	gtc	tac	atc	cac	6652	5
Lys	Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Met	Arg	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Tyr	Ile	His		
		2075					2080				2085						
ttg	gct	gag	cga	ttg	ggg	acc	ccc	gag	ctc	agc	gtg	gcc	gag	cgg	aag	6700	10
Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Gly	Thr	Pro	Glu	Leu	Ser	Val	Ala	Glu	Arg	Lys		
		2090				2095					2100						
gag	ctg	gag	agc	aag	ctg	aag	gag	cga	gag	gag	ttc	ctc	ctt	ccc	atc	6748	15
Glu	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Arg	Glu	Glu	Phe	Leu	Leu	Pro	Ile		
		2105			2110					2115				2120			
tac	cac	cag	gtg	gcc	gtg	cag	ttt	gca	gac	ctg	cac	gac	acc	ccg	ggc	6796	20
Tyr	His	Gln	Val	Ala	Val	Gln	Phe	Ala	Asp	Leu	His	Asp	Thr	Pro	Gly		
			2125					2130					2135				
cgc	atg	cag	gag	aag	ggg	gtc	att	aac	gac	atc	ctg	gat	tgg	aag	act	6844	25
Arg	Met	Gln	Glu	Lys	Gly	Val	Ile	Asn	Asp	Ile	Leu	Asp	Trp	Lys	Thr		
		2140				2145						2150					
tca	cgc	acc	ttc	ttc	tac	tgg	cgg	ctg	agg	cgg	ctg	ttg	ctg	gag	gac	6892	30
Ser	Arg	Thr	Phe	Phe	Tyr	Trp	Arg	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp		
		2155				2160					2165						
ctg	gtc	aag	aag	aaa	atc	cac	aat	gcc	aat	ccc	gag	ctg	aca	gac	ggc	6940	35
Leu	Val	Lys	Lys	Lys	Ile	His	Asn	Ala	Asn	Pro	Glu	Leu	Thr	Asp	Gly		
		2170			2175					2180							
cag	atc	cag	gcc	atg	cta	agg	cgc	tgg	ttt	gtg	gag	gtg	gag	gga	acc	6988	40
Gln	Ile	Gln	Ala	Met	Leu	Arg	Arg	Trp	Phe	Val	Glu	Val	Glu	Gly	Thr		
		2185			2190			2195						2200			
gtg	aag	gcc	tat	gtc	tgg	gac	aac	aac	aag	gat	ctg	gtg	gag	tgg	ctg	7036	45
Val	Lys	Ala	Tyr	Val	Trp	Asp	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Val	Glu	Trp	Leu		
			2205					2210					2215				
gag	aaa	cag	ctc	aca	gag	gaa	gac	ggc	gtc	cgc	tcg	gtg	att	gaa	gag	7084	50
Glu	Lys	Gln	Leu	Thr	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Arg	Ser	Val	Ile	Glu	Glu		
		2220					2225					2230					
aac	atc	aag	tac	atc	agc	aga	gac	tac	gtc	ctc	aag	cag	atc	cgc	agc	7132	55
Asn	Ile	Lys	Tyr	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Val	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Ser		
		2235				2240					2245						
ttg	gtc	cag	gcc	aac	cca	gag	gtt	gcc	atg	gat	tcc	atc	gtc	cac	atg	7180	60
Leu	Val	Gln	Ala	Asn	Pro	Glu	Val	Ala	Met	Asp	Ser	Ile	Val	His	Met		
		2250			2255					2260							
acg	cag	cac	atc	tcg	ccc	acc	cag	cga	gca	gaa	gtc	gtt	cgg	atc	ctc	7228	65
Thr	Gln	His	Ile	Ser	Pro	Thr	Gln	Arg	Ala	Glu	Val	Val	Arg	Ile	Leu		
		2265			2270			2275					2280				
tcg	acg	atg	gac	tcg	ccc	tca	acg	tag								7255	
Ser	Thr	Met	Asp	Ser	Pro	Ser	Thr										
			2285														

# DE 199 46 173 A 1

<210> 3  
 <211> 2288  
 <212> PRT  
 <213> Rind  
 5  
 <400> 3  
 Met Glu Gly Ser Ala Glu Glu Ser Lys Glu Met Arg Tyr Tyr Met Leu  
 1 5 10 15  
 10 Gln Arg Ser Ser Met Ser Gly Leu His Leu Val Lys Gln Gly Arg Asp  
 20 25 30  
 Arg Lys Lys Ile Asp Ser Gln Arg Asp Phe Thr Val Ala Ser Pro Ala  
 35 40 45  
 15 Glu Phe Val Thr Arg Phe Gly Gly Asn Lys Val Ile Glu Lys Val Leu  
 50 55 60  
 Ile Ala Asn Asn Gly Ile Ala Ala Val Lys Cys Met Arg Ser Ile Arg  
 65 70 75 80  
 20 Arg Trp Ser Tyr Glu Met Phe Arg Asn Glu Arg Ala Ile Arg Phe Val  
 85 90 95  
 Val Met Val Thr Pro Glu Asp Leu Lys Ala Asn Ala Glu Tyr Ile Lys  
 100 105 110  
 25 Met Ala Asp His Tyr Val Pro Val Pro Gly Gly Pro Asn Asn Asn Asn  
 115 120 125  
 30 Tyr Ala Asn Val Glu Leu Ile Leu Asp Ile Ala Lys Arg Ile Pro Val  
 130 135 140  
 Gln Ala Val Trp Ala Gly Trp Gly His Ala Ser Glu Asn Pro Lys Leu  
 145 150 155 160  
 35 Pro Glu Leu Leu Leu Lys Asn Gly Ile Ala Phe Met Gly Pro Pro Ser  
 165 170 175  
 Gln Ala Met Trp Ala Leu Gly Asp Lys Ile Ala Ser Ser Ile Val Ala  
 180 185 190  
 40 Gln Thr Ala Gly Ile Pro Thr Leu Pro Trp Ser Gly Ser Gly Leu Cys  
 195 200 205  
 Val Asp Trp His Glu Asn Asp Phe Ser Lys Arg Ile Leu Asn Val Pro  
 210 215 220  
 45 Gln Glu Leu Tyr Glu Lys Gly Tyr Val Lys Asp Val Asp Asp Gly Leu  
 225 230 235 240  
 50 Lys Ala Ala Glu Glu Val Gly Tyr Pro Val Met Ile Lys Ala Ser Glu  
 245 250 255  
 Gly Gly Gly Gly Lys Gly Ile Arg Lys Val Asn Asn Ala Asp Asp Phe  
 260 265 270  
 55 Pro Asn Leu Phe Arg Gln Val Gln Ala Glu Val Pro Gly Ser Pro Ile  
 275 280 285  
 Phe Val Met Arg Leu Ala Lys Gln Ser Arg His Leu Glu Val Gln Ile  
 290 295 300  
 60 Leu Ala Asp Gln Tyr Gly Asn Ala Ile Ser Leu Phe Gly Arg Asp Cys

65

# DE 199 46 173 A 1

305	310	315	320	
Ser Val Gln Arg Arg 325	His Gln Lys Ile 330	Ile Glu Glu Ala Pr 335	Ala Ala	5
Il Ala Thr Pr 340	Ala Val Phe Glu His 345	Met Glu Gln Cys 350	Ala Val Lys	
Leu Ala Arg Met Val Gly Tyr Val 355	Ser Ala Gly Thr Val 360	Glu Tyr Leu		10
Tyr Ser Gln Asp Gly Ser Phe Tyr Phe Leu Glu Leu Asn Pro Arg Leu 370	375	380		
Gln Val Glu His Pro Cys Thr Glu Met Val Ala Asp Val Asn Leu Pro 385	390	395		15
Ala Ala Gln Leu Gln Ile Ala Met Gly Ile Pro Leu Tyr Arg Ile Lys 405	410	415		
Asp Ile Arg Met Met Tyr Gly Val Ser Pro Trp Gly Asp Ala Pro Ile 420	425	430		20
Asp Phe Glu Asn Ser Ala His Val Pro Cys Pro Arg Gly His Val Ile 435	440	445		25
Ala Ala Arg Ile Thr Ser Glu Asn Pro Asp Glu Gly Phe Lys Pro Ser 450	455	460		
Ser Gly Thr Val Gln Glu Leu Asn Phe Arg Ser Asn Lys Asn Val Trp 465	470	475		30
Gly Tyr Phe Ser Val Ala Ala Ala Gly Gly Leu His Glu Phe Ala Asp 485	490	495		
Ser Gln Phe Gly His Cys Phe Ser Trp Gly Glu Asn Arg Glu Glu Ala 500	505	510		35
Ile Ser Asn Met Val Val Ala Leu Lys Glu Leu Ser Ile Arg Gly Asp 515	520	525		
Phe Arg Thr Thr Val Glu Tyr Leu Ile Lys Leu Leu Glu Thr Glu Ser 530	535	540		40
Phe Gln Leu Asn Arg Ile Gly Thr Gly Trp Leu Asp Arg Leu Ile Ala 545	550	555		
Glu Lys Val Gln Ala Glu Arg Pro Asp Thr Met Leu Gly Val Val Cys 565	570	575		45
Gly Ala Leu His Val Ala Asp Val Ser Leu Arg Asn Ser Ile Ser Asn 580	585	590		50
Phe Leu His Ser Leu Glu Arg Gly Gln Val Leu Thr Ala His Thr Leu 595	600	605		
Leu Asn Thr Val Asp Val Glu Leu Ile Tyr Glu Gly Val Lys Tyr Val 610	615	620		55
Leu Lys Val Thr Arg Gln Ser Pro Asn Ser Tyr Val Val Ile Met Asn 625	630	635		
Gly Ser Cys Val Glu Val Asp Val His Arg Leu Ser Asp Gly Gly Leu 645	650	655		60
				65

# DE 199 46 173 A 1

Leu Leu Ser Tyr Asp Val Ser Ser Tyr Thr Thr Tyr Met Lys Glu Glu  
 660 665 670  
 5 Val Asp Arg Tyr Arg Ile Thr Ile Gly Asn Lys Thr Cys Val Phe Glu  
 675 680 685  
 Lys Glu Asn Asp Pro Ser Val Leu Arg Ser Pro Ser Ala Gly Lys Leu  
 690 695 700  
 10 Ile Gln Tyr Ile Val Glu Asp Gly Gly His Val Phe Ala Gly Gln Cys  
 705 710 715 720  
 Tyr Ala Glu Ile Glu Val Met Lys Met Val Met Thr Leu Thr Ala Ala  
 725 730 735  
 15 Glu Ser Gly Cys Ile His Tyr Val Lys Arg Pro Gly Ala Ala Leu Asp  
 740 745 750  
 Pro Gly Cys Val Ile Ala Lys Met Gln Leu Asp Asn Pro Ser Lys Val  
 755 760 765  
 20 Gln Gln Ala Glu Leu His Thr Gly Ser Leu Pro Arg Ile Gln Ser Thr  
 770 775 780  
 Ala Leu Arg Gly Glu Lys Leu His Arg Val Phe His Tyr Val Leu Asp  
 25 785 790 795 800  
 Asn Leu Val Asn Val Met Asn Gly Tyr Cys Leu Pro Asp Pro Phe Phe  
 805 810 815  
 30 Ser Ser Arg Val Lys Asp Trp Val Glu Arg Leu Met Lys Thr Leu Arg  
 820 825 830  
 Asp Pro Ser Leu Pro Leu Leu Glu Leu Gln Asp Ile Met Thr Ser Val  
 835 840 845  
 35 Ser Gly Arg Ile Pro Pro Asn Val Glu Lys Ser Ile Lys Lys Glu Met  
 850 855 860  
 Ala Gln Tyr Ala Ser Asn Ile Thr Ser Val Leu Cys Gln Phe Pro Ser  
 865 870 875 880  
 40 Gln Gln Ile Ala Asn Ile Leu Asp Ser His Ala Ala Thr Leu Asn Arg  
 885 890 895  
 Lys Ser Glu Arg Glu Val Phe Phe Met Asn Thr Gln Ser Ile Val Gln  
 45 900 905 910  
 Leu Val Gln Arg Tyr Arg Ser Gly Ile Arg Gly His Met Lys Ala Val  
 915 920 925  
 Val Met Asp Leu Leu Arg Gln Tyr Leu Arg Val Glu Thr Gln Phe Gln  
 50 930 935 940  
 Asn Gly His Tyr Asp Lys Cys Val Phe Ala Leu Arg Glu Glu Asn Lys  
 945 950 955 960  
 55 Ser Asp Met Asn Thr Val Leu Asn Tyr Ile Phe Ser His Ala Gln Val  
 965 970 975  
 Thr Arg Lys Asn Leu Leu Val Thr Met Leu Ile Asp Gln Leu Cys Gly  
 980 985 990  
 60 Arg Gly Pro Thr Leu Thr Asp Glu Leu Leu Asn Ile Leu Thr Glu Leu

# DE 199 46 173 A 1

995	1000	1005	
Thr Gln Leu Ser Lys Thr Thr Asn Ala Lys Val Ala Leu Arg Ala Arg 1010 1015 1020			5
Gln Val Leu Ile Ala Ser His Leu Pro Ser Tyr Glu Leu Arg Leu Asn 025 1030 1035 1040			
Gln Val Glu Ser Ile Phe Leu Ser Ala Ile Asp Met Tyr Gly His Gln 1045 1050 1055			10
Phe Cys Ile Glu Asn Leu Gln Lys Leu Ile Leu Ser Glu Thr Ser Ile 1060 1065 1070			
Phe Asp Val Leu Pro Asn Phe Phe Tyr His Ser Asn Gln Val Val Arg 1075 1080 1085			15
Met Ala Ala Leu Glu Val Tyr Val Arg Arg Ala Tyr Ile Ala Tyr Glu 1090 1095 1100			
Leu Asn Ser Val Gln His Arg Gln Leu Lys Asp Asn Thr Cys Val Val 1105 1110 1115 1120			20
Glu Phe Gln Phe Met Leu Pro Thr Ser His Pro Asn Arg Gly Asn Ile 1125 1130 1135			25
Pro Thr Leu Asn Arg Met Ser Phe Ser Ser Asn Leu Asn His Tyr Gly 1140 1145 1150			
Met Thr His Val Ala Ser Val Ser Asp Val Leu Leu Asp Asn Ala Phe 1155 1160 1165			30
Thr Pro Pro Cys Gln Arg Met Gly Gly Met Val Ser Phe Arg Thr Phe 1170 1175 1180			
Glu Asp Phe Val Arg Ile Phe Asp Glu Val Met Gly Cys Phe Cys Asp 185 1190 1195 1200			35
Ser Pro Pro Gln Ser Pro Thr Phe Pro Glu Ala Gly His Thr Ser Leu 1205 1210 1215			
Tyr Asp Glu Asp Lys Val Pro Arg Asp Glu Pro Ile His Ile Leu Asn 1220 1225 1230			40
Val Ala Ile Lys Thr Asp Cys Asp Ile Glu Asp Asp Ser Leu Ala Ala 1235 1240 1245			
Met Phe Arg Glu Phe Thr Gln Gln Asn Lys Ala Thr Leu Val Glu His 1250 1255 1260			45
Gly Ile Arg Arg Leu Thr Phe Leu Val Ala Gln Lys Asp Phe Arg Lys 265 1270 1275 1280			50
Gln Val Asn Tyr Glu Val Asp Gln Arg Phe His Arg Glu Phe Pro Lys 1285 1290 1295			
Phe Phe Thr Phe Arg Ala Arg Asp Lys Phe Glu Glu Asp Arg Ile Tyr 1300 1305 1310			55
Arg His Leu Glu Pro Ala Leu Ala Phe Gln Leu Glu Leu Asn Arg Met 1315 1320 1325			
Arg Asn Phe Asp Leu Thr Ala Ile Pro Cys Ala Asn His Lys Met His 1330 1335 1340			60

65

# DE 199 46 173 A 1

Leu Tyr Leu Gly Ala Ala Lys Val Glu Val Gly Thr Glu Val Thr Asp  
 345 1350 1355 1360  
 5 Tyr Arg Phe Phe Val Arg Ala Ile Ile Arg His Ser Asp Leu Val Thr  
 1365 1370 1375  
 Lys Glu Ala Ser Phe Glu Tyr Leu Gln Asn Glu Gly Glu Arg Leu Leu  
 1380 1385 1390  
 10 Leu Glu Ala Met Asp Glu Leu Glu Val Ala Phe Asn Asn Thr Asn Val  
 1395 1400 1405  
 Arg Thr Asp Cys Asn His Ile Phe Leu Asn Phe Val Pro Thr Val Ile  
 1410 1415 1420  
 15 Met Asp Pro Ser Lys Ile Glu Glu Ser Val Arg Ser Met Val Met Arg  
 425 1430 1435 1440  
 Tyr Gly Ser Arg Leu Trp Lys Leu Arg Val Leu Gln Ala Glu Leu Lys  
 1445 1450 1455  
 20 Ile Asn Ile Arg Leu Thr Pro Thr Gly Lys Ala Ile Pro Ile Arg Leu  
 1460 1465 1470  
 Phe Leu Thr Asn Glu Ser Gly Tyr Tyr Leu Asp Ile Ser Leu Tyr Lys  
 1475 1480 1485  
 Glu Val Thr Asp Ser Arg Thr Ala Gln Ile Met Phe Gln Ala Tyr Gly  
 1490 1495 1500  
 30 Asp Lys Gln Gly Pro Leu His Gly Met Leu Ile Asn Thr Pro Tyr Val  
 505 1510 1515 1520  
 Thr Lys Asp Gln Leu Gln Ser Lys Arg Phe Gln Ala Gln Ser Leu Gly  
 1525 1530 1535  
 35 Thr Thr Tyr Ile Tyr Asp Ile Pro Glu Met Phe Arg Gln Ser Leu Ile  
 1540 1545 1550  
 Lys Leu Trp Glu Ser Met Ser Ser Gln Ala Phe Leu Pro Pro Pro Pro  
 1555 1560 1565  
 40 Leu Pro Ser Asp Ile Leu Thr Tyr Thr Glu Leu Val Leu Asp Asp Gln  
 1570 1575 1580  
 Gly Gln Leu Val His Met Asn Arg Leu Pro Gly Gly Asn Glu Ile Gly  
 585 1590 1595 1600  
 45 Met Val Ala Trp Lys Met Thr Leu Lys Ser Pro Glu Tyr Pro Asp Gly  
 1605 1610 1615  
 Arg Asp Ile Ile Val Ile Gly Asn Asp Ile Thr Tyr Arg Ile Gly Ser  
 1620 1625 1630  
 50 Phe Gly Pro Gln Glu Asp Leu Leu Phe Leu Arg Ala Ser Glu Leu Ala  
 1635 1640 1645  
 55 Arg Ala Glu Gly Ile Pro Arg Ile Tyr Val Ala Ala Asn Ser Gly Ala  
 1650 1655 1660  
 Arg Ile Gly Leu Ala Glu Glu Ile Arg His Met Phe His Val Ala Trp  
 665 1670 1675 1680  
 60 Val Asp Pro Glu Asp Pro Tyr Lys Gly Tyr Lys Tyr Leu Tyr Leu Thr

# DE 199 46 173 A 1

1685	1690	1695	
Pro Gln Asp Tyr Lys Arg Val Ser Ala Leu Asn Ser Val His Cys Glu 1700 1705 1710			5
His Val Glu Asp Glu Gly Glu Ser Arg Tyr Lys Ile Thr Asp Ile Ile 1715 1720 1725			
Gly Lys Glu Glu Gly Leu Gly Ala Glu Asn Leu Arg Gly Ser Gly Met 1730 1735 1740			10
Ile Ala Gly Glu Ser Ser Leu Ala Tyr Asp Glu Ile Ile Thr Ile Ser 745 1750 1755 1760			
Leu Val Thr Cys Arg Ala Ile Gly Ile Gly Ala Tyr Leu Val Arg Leu 1765 1770 1775			15
Gly Gln Arg Thr Ile Gln Val Glu Asn Ser His Leu Ile Leu Thr Gly 1780 1785 1790			
Ala Gly Ala Leu Asn Lys Val Leu Gly Arg Glu Val Tyr Thr Ser Asn 1795 1800 1805			20
Asn Gln Leu Gly Gly Ile Gln Ile Met His Asn Asn Gly Val Thr His 1810 1815 1820			25
Ser Thr Val Cys Asp Asp Phe Glu Gly Val Phe Thr Val Leu His Trp 825 1830 1835 1840			
Leu Ser Tyr Met Pro Lys Ser Val Tyr Ser Ser Val Pro Leu Leu Asn 1845 1850 1855			30
Ser Lys Asp Pro Ile Asp Arg Val Ile Glu Phe Val Pro Thr Lys Ala 1860 1865 1870			
Pro Tyr Asp Pro Arg Trp Met Leu Ala Gly Arg Pro His Pro Thr Gln 1875 1880 1885			35
Lys Gly Gln Trp Leu Ser Gly Phe Phe Asp Tyr Gly Ser Phe Ser Glu 1890 1895 1900			
Ile Met Gln Pro Trp Ala Gln Thr Val Val Val Gly Arg Ala Arg Leu 905 1910 1915 1920			40
Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Val Ala Val Glu Thr Arg Thr Val Glu 1925 1930 1935			
Leu Ser Ile Pro Ala Asp Pro Ala Asn Leu Asp Ser Glu Ala Lys Ile 1940 1945 1950			45
Ile Gln Gln Ala Gly Gln Val Trp Phe Pro Asp Ser Ala Phe Lys Thr 1955 1960 1965			50
Tyr Gln Ala Ile Lys Asp Phe Asn Arg Glu Gly Leu Pro Leu Met Val 1970 1975 1980			
Phe Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly Gly Met Lys Asp Met Tyr Asp 985 1990 1995 2000			55
Gln Val Leu Lys Phe Gly Ala Tyr Ile Val Asp Gly Leu Arg Glu Cys 2005 2010 2015			
Ser Gln Pro Val Met Val Tyr Ile Pro Pro Gln Ala Glu Leu Arg Gly 2020 2025 2030			60

65



Gly S r Trp Val Val Ile Asp Pro Thr Ile Asn Pro Arg His Met Glu  
 2035 2040 2045  
 5 Met Tyr Ala Asp Arg Glu Ser Arg Gly Ser Val Leu Glu Pro Glu Gly  
 2050 2055 2060  
 Thr Val Glu Ile Lys Phe Arg Arg Lys Asp Leu Val Lys Thr Met Arg  
 065 2070 2075 2080  
 10 Arg Val Asp Pro Val Tyr Ile His Leu Ala Glu Arg Leu Gly Thr Pro  
 2085 2090 2095  
 Glu Leu Ser Val Ala Glu Arg Lys Glu Leu Glu Ser Lys Leu Lys Glu  
 2100 2105 2110  
 15 Arg Glu Glu Phe Leu Leu Pro Ile Tyr His Gln Val Ala Val Gln Phe  
 2115 2120 2125  
 Ala Asp Leu His Asp Thr Pro Gly Arg Met Gln Glu Lys Gly Val Ile  
 2130 2135 2140  
 20 Asn Asp Ile Leu Asp Trp Lys Thr Ser Arg Thr Phe Phe Tyr Trp Arg  
 145 2150 2155 2160  
 Leu Arg Arg Leu Leu Leu Glu Asp Leu Val Lys Lys Lys Ile His Asn  
 25 2165 2170 2175  
 Ala Asn Pro Glu Leu Thr Asp Gly Gln Ile Gln Ala Met Leu Arg Arg  
 2180 2185 2190  
 30 Trp Phe Val Glu Val Glu Gly Thr Val Lys Ala Tyr Val Trp Asp Asn  
 2195 2200 2205  
 Asn Lys Asp Leu Val Glu Trp Leu Glu Lys Gln Leu Thr Glu Glu Asp  
 2210 2215 2220  
 35 Gly Val Arg Ser Val Ile Glu Glu Asn Ile Lys Tyr Ile Ser Arg Asp  
 225 2230 2235 2240  
 Tyr Val Leu Lys Gln Ile Arg Ser Leu Val Gln Ala Asn Pro Glu Val  
 2245 2250 2255  
 40 Ala Met Asp Ser Ile Val His Met Thr Gln His Ile Ser Pro Thr Gln  
 2260 2265 2270  
 Arg Ala Glu Val Val Arg Ile Leu Ser Thr Met Asp Ser Pro Ser Thr  
 2275 2280 2285  
 45

## Patentansprüche

1. Nukleinsäure, welche eine DNA-Sequenz umfaßt, die  
 50 a) die in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 dargestellte Sequenz;  
 b) eine allelischen Variante davon; oder  
 c) eines Fragmentes der Sequenzen nach a) oder b)  
 aufweist, wobei das Fragment mindestens einen der Bereiche von Nukleotid 933 bis 966, 2188 bis 2219 oder 3055  
 bis 3495 der SEQ ID NO: 1, den Bereich von Nukleotid 1 bis 441 der SEQ ID NO: 2 oder den entsprechenden Be-  
 55 reich einer allelischen Variante umfaßt.  
 2. Vektor, der eine Nukleinsäure nach Anspruch 1 umfaßt.  
 3. Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure umfaßt, die den Bereich von Nukleotid 2188 bis 2219 der SEQ ID NO:  
 1 aufweist.  
 4. Expressionsvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure den Bereich von Nukleotid  
 60 1 bis 3445 der SEQ ID NO: 1 umfaßt.  
 5. Expressionsvektor nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotide der SEQ ID NO: 1 in  
 dem Vektor operativ mit einem Strukturgen verknüpft sind.  
 6. Expressionsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturgen ein Fremdgen ist.  
 7. Wirtszelle, die einen Vektor nach einem der Ansprüche 2 bis 6 enthält.  
 65 8. Wirtszelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryotische Zelle handelt.  
 9. Wirtszelle nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Zelle eines nicht-menschlichen Säu-  
 getiers handelt.  
 10. Wirtszelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Milchdrüsenepithelzelle handelt.

11. Transgenes nicht-menschliches Säugetier, dadurch gekennzeichnet, daß es Zellen nach Anspruch 9 aufweist.
12. Transgenes nicht-menschliches Säugetier nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Rind handelt.
13. Verwendung einer Nukleinsäure zur Expression von Fremdgenen, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz der Nukleinsäure die Nukleotide 2188 bis 2219 der SEQ ID NO: 1 umfaßt, die operativ mit einem Strukturgen verknüpft sind. 5
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure die Nukleotide 1 bis 3445 der SEQ ID NO: 1 umfaßt.
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression in eukaryotischen Zellen erfolgt. 10
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression in Zellen eines nicht-menschlichen Säugetiers erfolgt.
17. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression in der Milchdrüse eine nicht-menschlichen Säugetiers erfolgt.
18. Verfahren zur Erzeugung von nicht-menschlichen transgenen Säugetieren, deren Milch einen verringerten Milchfett-Gehalt aufweist, bei dem man die DNA-Sequenz des Milchdrüsen-spezifischen Promotors der Acc $\alpha$  oder die DNA-Sequenz des Acc $\alpha$ -Strukturgens im Genom der nicht-menschlichen transgenen Säugetiere mindestens teilweise durch eine Sequenz ersetzt, die durch Deletion oder Substitution von einzelnen oder mehreren Nukleotiden so verändert wurde, daß die Expression der Acc $\alpha$  in der Milchdrüse gehemmt wird. 15
19. Verfahren nach Anspruch 18, bei dem man
  - a) eine Nukleinsäure erstellt, welche eine DNA-Sequenz umfaßt, die durch Deletion oder Substitution von einzelnen oder mehreren Nukleotiden von der DNA-Sequenz des Milchdrüsen-spezifischen Promotors der Acc $\alpha$  oder von der DNA-Sequenz des Acc $\alpha$ -Strukturgens abgeleitet wurde;
  - b) die Zelle eines nicht-menschlichen Säugetiers mit der Nukleinsäure nach Stufe a) transfiziert;
  - c) Zellen, in denen die natürliche DNA-Sequenz im Genom durch die entsprechende Nukleinsäure nach Stufe a) ausgetauscht wurde, auswählt und zu Tieren regeneriert. 20
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, bei dem die transgenen nicht-menschlichen Säugetiere Rinder, Schafe oder Ziegen sind.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, bei dem die Sequenz des Milchdrüsen-spezifischen Promotors der Acc $\alpha$  die Sequenz von Nukleotid 1 bis 3054 der SEQ ID NO: 1 umfaßt. 30
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, bei dem man mindestens eine Substitution oder Deletion im Bereich Nukleotid 2205 bis 2213 der SEQ ID NO: 1 vornimmt.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, bei dem man mindestens eine Substitution oder Deletion im Bereich von Nukleotid 2188 bis 2239 der SEQ ID NO: 1 vornimmt.
24. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, bei dem man mindestens eine Substitution oder Deletion im Bereich Nukleotid 3055 bis 3495 der SEQ ID NO: 1 vornimmt. 35
25. Verfahren nach Anspruch 24, bei dem man den gesamten Bereich von Nukleotid 3055 bis 3495 der SEQ ID NO: 1 deletiert.
26. Transgenes nicht-menschliches Säugetier, dadurch gekennzeichnet, daß es nach einem Verfahren der Ansprüche 18 bis 25 erzeugt wurde. 40
27. Verfahren zur Gewinnung von Milch mit verringertem Milchfett-Gehalt, bei dem man die Milch von transgenen nicht-menschlichen Säugetieren nach Anspruch 26 gewinnt.
28. Verfahren zur Genotypisierung von Rindern, bei dem man eine DNA-Sequenz des Genoms eines Rindes analysiert, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz die Nukleotide 933 bis 966 der SEQ ID NO: 1 umfaßt.
29. Verfahren nach Anspruch 28, bei dem die DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert. 45
30. Verfahren nach Anspruch 29, bei dem Primer eingesetzt werden, die in der PCR Reaktion mit der natürlichen DNA-Sequenzen des Rindes hybridisieren, welche die Nukleotide 933 bis 966 der SEQ ID NO: 1 flankieren.
31. Verfahren nach Anspruch 30, bei dem man die Primer
 

AccmsP3f 5'-CATTTATCTGGCTTTGCATCTTAG und

AccmsP3r 5'-CAGGTGGTCACAAAGAGTCTG

50

verwendet.

- 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 31, bei dem man die Analyse der Sequenz mittels Gelelektrophorese des amplifizierten Fragmentes durchführt. 55

---

Hierzu 13 Seite(n) Zeichnungen

---

60

65

Fig. 1A

**Klon 1**  
 1 GATATCATCC CATTATATATA TCCAGAACAG GCAAATCTAT AAAGACAGAA AGTAGATTAG  
 61 TCATTGCTTA GGACTGGGGA GTGGTTTGAG GGAAATATGG ACTGACTGCT GCCGAGTACA  
 121 GGGTTTCTTT GGCGGGTGCT GAAAATGTTC CAAAATGGAC TTGTGATGAT GGTTCGCAAC  
 181 TCTGTGACTG TAAGGAAAAC CATTGAATTA TATACTGTAA ATGGCCAAAA TATATGGTAT  
 241 GTGAATTCTG TCTCAATAAA GTTAAGGATT TTTAAATGG GTGTATGATC CATAACAAAA  
 301 AATTAGTTGC ATTTCTATGT ACTAGCTAGC AATGAGCAAG CAAAAAATAA AAAAAAATT  
 361 AAATAATTTT ATTCAGAATG GCATCAAAAA GAATAAATAA CTTAGGAATC AATTGAACAA  
 421 AAAAGCATAA GACTTGTACA TTAAATTTGT TACATTGCTG AGAGAAATTA AAGTCTGCTG  
 481 CTACTGCGGT TTAGTCACTT AAGTCATATC TGATTCTTTC TCAGCCCCGT GGACTGTAGC  
 541 CCACCAGGCT CCTCTGTCCG TGGGATTTCC CAGGCAAGAA CACTGCAGTG AGTTGCCATT  
 601 TCCTTCTCCA GGGGATCTTT CCAACCCAGG AACTGAACCT ATGTCTCCTG CTTGGCAGGT  
**Klon 2**  
 661 GAATCTTTA CCCCAGTCC TCTGCCTTGC AAGGTGGATG CTTAACCCT AGAGCACCAG  
 721 GGAAGTTCCA CAGCTAAACC TTTTATATA TAAAAAGGTT GATCCTCTTC TTCTTCTTCT  
 781 TTTTCTTTT TCCCAATATT CATTATCTG GCTTTCATC TTAGTTGTGG TATGTGTGGT  
 841 CTTCCATCAT CATTGCTGGG CTCTTTGGTT GCAACATGCG AATTTTATAG TGTGGTGTGT  
**polymorpher Mikrosatellit**  
 901 GAGATCTAGT ACCCTAGTAT GTGTGTGTTT TTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT  
 961 GTGTGTGCTT TTTGTGTCAG ACTCTTTGTG ACCACCTGGA CTGTAGTCCA TCAGGCTCCT  
 1021 TTGTCAGTGG AATTTCCAG GCGAGAATAC CGGAGTGGGT TGCCATTTC TAGTTCCCTG  
 1081 ACCAAGGATC AAACCCAGCC GCACCTCCCC CACCCCGGCC CCCCAGGTT GGGAGTGTAG  
 1141 AGTCTCAGCC CCTGGAGCAG GAGGGAAGTC CCTAACAGCA GACTGATTTT CCAAAGAGGT  
 1201 ACATCCCTGA TGCAAGATTT CTTTGCTTGG GAAAGCCCCA GCGTAAAAAC ACTGTCTCCC  
 1261 AGCGTGTGCT GCAGTATAAC TCAGACTGCC TTGCAACGGA GCCAGCTAAA TGCATCACTG  
 1321 TCTGCCGATG AAATGCTAC GTCATCCTTG GTGCTTGGCA TGTTCATATG CTGGGGTCAG  
 1381 TGTGGGCTTC TAGTTGGATT TGGTGCCAGG TATGTGTCTA CTTTGGACAC TCTCTTTTCA  
 1441 TGTTAGATTA AAAATGAGGG TGCCTTGAAT TTGGAGGAAC GAATGTGCGA ATGTGGCCTT  
 1501 TTATTTCTTG TGTCTCACA TTATAGGAAG ATGGTGGGCA GCATCCGTAA AAGATGAGAA  
 1561 ACACTAGCTT TGTTTGGAG CTGGGTGTGC CCTGTTAGCG TTTGGTTGTT TTAGAAAGAT  
 1621 CCCCCCTGGT AAGGGAAGCA CAAGCTTGAT TCCCAGAGT GCCTCTTAG TATATTTT  
 1681 TATATAATCA AGAGCAAAAT AACCTGCTTT TTTTCTATAT GCCATTCTTT GCTTTTGA  
 1741 TGTTGAACCT AACAAAGGCA GAGAGTGATT CTCTTCTGGA AAGTGCCTGA TCTAGAGACC  
 1801 CTTAGATGTG TGTAATAATT AAGCTGCTTC TACATCTGTG GTCACCGTAA TTGTTCTGAA  
 1861 CCAAAGGCTT CAGTGCTCTT TTTTGTAGA CTTGTTATCC TGAAGAGAGA TCAAGATAGG  
 1921 AGGATTCCTC TGCACTGTCT TCTTTAAAGG AAAAAGTAAA CTTTACTGAC TTTATCAGAC  
 1981 GTTAGCACAG TGTAAGGGA GTGATGCAGA GTTCGGAAAC CAATCCAGGA CTTCTCTTT  
 2041 TTTTATATTA TGACTAATGG TCATATTGAG TGAGTGGCCT GATTGAGTCT TTTACCTTG  
 2101 GGTCACTGA ATGTCCTAAC ATCAAGGTTT ATCTTAATAA TTTATCTTCT ATTTGATTTT  
**STAT5 Bindung**  
 2161 TATCTGTGTT CCAGATCATT TGTGTACTTC TGTTTTGAAG GGTTCCTG GAAATGTTAAT  
 2221 AGATTCGCGG CATAGTTGCA TCAGATAAGA GTTAACCATT TGTATTCAAC ATTTCCGTGA  
 2281 GAAGGAATTT TTCTGTGGTG CCTGAATCAG GTTAGATGTG ACTCTGGTGA ATTAATACCA  
**Klon 3**  
 2341 TTCCTGAGGA CTTGGCTCAG GAAATCATGA TCTTTTCTGC CATGACAAGG GAGCAGTATT  
 2401 TTCAGCATCT ACTTAATTAA AAGCTAAAAC AGGATACCAT TTCCCTTTCA GTCACCATTT  
 2461 CTTTATTTAA GTGGCTTATC GCTCTGTGGC AAATGAGCAT AACAATAGAT GTGTCCCCGT  
 2521 GGCTTTTAGG CAGGGTTTTT CTCCCCTGCT TAAACGCCGG GTTAGACCTG TGTCTAAAAT  
 2581 ACTTGTCTGG GCCCTTTAC GTTCTGTGTA CTTTATCCA CATCCTCTCT GTTATCCTGT  
 2641 TTGTGCCAGC TCCAGTCTTA TTCTCAAATT TTAGTGAATA AGATCTTAGA TTTTGTGTGT  
 2701 TTTAAAAAAA GGTGTGTGTA CACCACTACT CTGGCCTTAA AATTAGAGTT GTGACCCCCA  
 2761 CTTTATTTCA AGTTCTCAG TGGTGGCGTG TCTCGTCTTT CTGACCGGCT TGCTTTCCCT  
 2821 CTTGACCTGC TCTCCCCCG TCTTGGAGTC TGAACTCAG TCTTACTTGT TGTGATTGGG  
 2881 TCTCAGAAAT CACCTGTCTT TCTCTCTTCC CTCTAGATT CCGACCCCA TTATTTCTG  
 2941 GGCATAGCTG TCCTCATAAG CTTGGTCTTC TCTTTTGGCC CTGAGCCTTC CCTGTCACGT  
**Exon 5A**  
 3001 GCCCTGGCA GCCTGGAGAG GCCGCGGAGC CTCTCTAGTG ACCGTGAGAA GAAGTGACC  
 3061 GTTGTAAAG CACTTTTGCT GCAGCTAAGG CGGAAGCTGC TGAGATCTAC TTTAGAGTTA  
 3121 TACCTGCTTC TATATTTCTC CCCCTCTCTT CTCTGTCCCC TTGGGAAATC AGCTGATGCT  
 3181 GTGTGGGAGC CCAAGTAAAT GGGGGGGGGG GCAAACAGGA GGGGAAGTAT GGAGATTGGG

**Fig. 1B**

```
3241 GACAGAGTAG ACAAAAAGAC TGTGGTTTGA GGCCATGAGG AGTACTCTAC TCTGACTGAA
3301 GCAGGTCCAA GAAGTAGGCA GAAGGCACAG TATCTTTTGT CCTCCTGGGT TTTAAGCACC
3361 TGCAGCGGGA GGACGAACTC CAGCTTGTGT TTACAAGGCC GACAGCTGAA GAGAAAAACC
3421 TCTATTCCTT TGCCATCTTG ATATGGAGGG TTCTGCGGAG GAGAGTAAGG AAATGAGATA
      └─ Intron 5A
3481 TTACATGCTT CAAAGGTAAG TGTTAGAGGG CCCTATCTAG GCAATATATG CCTTTTAAAA
3541 GCAGTAAAGG CGTTGACAGC TAAGCCCTGG AATTATGGGC AGTCTGATTG GATGATTTTT
3601 TTGTGGGTCT GTAGGAAACT CTTTTTTTTC TTAAGGAATG AATTAAATCT ATGTTGCTCC
3661 TGATTCTGAC CTTATTTTCC TCAGATTGAC
```

Fig. 2A

1 GTGACCGTTG TTAAAGCACT TTTGCTGCAG CTAAGGCGGA AGCTGCTGAG ATCTACTTTA  
 61 GAGTTATACC TGCTTCTATA TTTCTCCCC TCTCTTCTCT GTCCCTTGG **GAAATCAGCT**  
 121 **GATGCTGTGT** GGGAGCCCAG TGTAATGGGA GGGGGGGCAA ACAGGAGGGG AAGTATGGAG  
 181 ATTGGGGACA GAGTAGACAA AAAGACTGTG GTTTGAGGCC ATGAGGAGTA CTCTACTCTG  
 241 ACTGAAGCAG GTCCAAGAAG TAGGCAGAAG GCACAGTATC TTTTGTCTC CTGGGTTTTA  
 301 AGCACCTGCA GCGGGAGGAC GAACTCCAGC TTGTGTTTAC **AAGGCCGACA** **GCTGAAGAGA**  
 361 AAAACCTCTA TTCCTTTGCC ATCTTGATAT **GGAGGGTCT** GCGGAGGAGA GTAAGGAAAT  
 Exon 5A ← Exon 6  
 421 GAGATATTAC ATGCTTCAAA **GATCCAGCAT** GTCTGGCTTG CACCTAGTCA AGCAAGGTGG  
 481 AGACCGAAAG AAAATAGACT CACAGCGAGA **TTTCACTGTA** **GCCTCTCCAG** **CAGAATTTGT**  
 Exon 7  
 541 TACTCGTTTT GGTGGGAATA AAGTGATTGA **GAAGTTCTC** **ATTGCCAACA** ATGGCATTGC  
 601 AGCTGTGAAA TGCAATGAGAT CCATCCGCCG GTGGTCTTAT GAGATGTTTC GAAATGAACG  
 661 TGCAATCCGA TTTGTGTGCA TGGTCACACC TGAAGACCTG AAAGCCAATG CAGAATACAT  
 721 TAAGATGGCG GATCACTACG TGCCCGTGCC AGGAGGCCCC AACAACAACA ACTATGCAAA  
 781 TGTGGAGTTA ATTCTTGACA TTGCTAAAAA GATCCCCGTG CAAGCAGTTT GGGCTGGCTG  
 841 GGGTCATGCT TCTGAGAATC CCAAGCTCCC AGAAGTTCTC TTGAAAAATG GCATCGCCTT  
 901 CATGGGTCCCT CCAAGCCAAG CCATGTGGGC TCTGGGGGAT AAGATCGCAT CTTCCATAGT  
 961 GGCTCAAACCT GCTGGTATCC CAACTCTTCC ATGGAGTGGC AGTGGTCTTT GTGTGGACTG  
 1021 GCACGAAAAT GATTTTTCAA AACGAATTTT AAATGTTTCT CAGGAACTAT ATGAAAAAGG  
 1081 TTATGTGAAG GATGTGGATG ATGGGCTGAA GGCAGCGGAG GAAGTTGGAT ATCCAGTAAT  
 1141 GATCAAGGCC TCAGAAGGAG GAGGAGGGAA GGAATCAGA AAAGTCAACA ATGCAGATGA  
 1201 CTTCCCTAAC CTCTCCGAC AGGTTCAAGC TGAAGTTCTT GGGTCTCCTA TCTTTGTCAT  
 1261 GAGACTAGCC AAACAGTCTC GTCATCTGGA GGTGCAGATC TTAGCAGATC AGTATGGCAA  
 1321 TGCTATCTCT TTGTTTGGTC GTGATTGCTC TGTGCAACGC AGGCATCAGA AGATTATTGA  
 1381 AGAAGCTCCT GCTGCTATTG CTACTCCAGC AGTATTTGAA CATATGGAAC AGTGTGCGGT  
 1441 GAACTTGCC AGGATGGTTG GTTATGTGAG TGGGGGACT GTGGAATACC TCTACGCCA  
 1501 GGATGGCAGC TTCTACTTTC TGGAACTGAA CCCTCGGCTA CAGGTGGAGC ACCCTGGTAC  
 1561 AGAGATGGTG GCCGATGTCA ACCTCCCTGC TGGCGAGCTC CAGATTGCCA TGGGGATCCC  
 1621 TCTGTACAGA ATCAAGGATA TCCGAATGAT GTACGGGGTC TCTCCCTGGG GCATGCTCC  
 1681 CATTGATTTT GAAAATTCGG CTCACGTTC TGGCCCAAGG GGCCATGTTA TTGCTGCTCG  
 1741 TATCACTAGT GAAAATCCAG ATGAGGGTTT TAAGCCCAGC TCAGGAACAG TTCAAGAGCT  
 1801 GAATTTTCGC AGCAATAAGA ACGTTTGGGG TTATTTCACT GTTGCTGCTG CAGGAGGGCT  
 1861 TCATGAATTT GCTGATTCTC AGTTTGGTCA CTGCTTTTCC TGGGGAGAAA ACCGAGAGGA  
 1921 AGCAATTTCA AACATGGTTG TGGCTTTGAA GGAGCTGTCT ATCCGGGGCG ACTTCCGGAC  
 1981 CACAGTCGAG TACCTGATCA AACTGCTGGA GACTGAAAGC TTTCACTTGA ACAGAATTGG  
 2041 CACGGGCTGG CTGGACAGAC TGATAGCAGA AAAAGTACAG GCGGAGCGAC CTGACACCAT  
 2101 GCTGGGAGTT GTCTGTGGGG CTCTCCATGT GGCAGACGTG AGCCTGCGGA ATAGCATCTC  
 2161 CAATCTCCTT CACTCCTTAG AGAGGGGTCA AGTCCTCACT GCTCATACCC TTCTGAATAC  
 2221 AGTAGATGTT GAACTTATCT ACGAGGGAGT GAAGTATGTA CTGAAGGTGA CTCGACAGTC  
 2281 CCCGAACCTC TACGTGGTGA TCATGAACGG CTCGTGTGTG GAAGTAGACG TGCATCGACT  
 2341 GAGCGACGGT GGAATGCTCT TGTCTATGTA CGTCAGCAGT TACACCACGT ACATGAAGGA  
 2401 GGAGGTGGAT AGATATCGCA TCACAATTGG CAATAAAACT TGTGTGTTTG AGAAGGAAAA  
 2461 TGACCCTTCG GTGCTGCGCT CACCCTCTGC TGGGAAGTTG ATCCAGTACA TTGTGGAGGA  
 2521 TGGAGGCCAC GTGTTTGTG GCGAGTGCTA TGCCGAGATC GAGGTGATGA AGATGGTAAT  
 2581 GACCTTAACA GCGCAGAGT CTGGCTGTAT CCATTATGTC AAGCGGCCTG GAGCAGCTCT  
 2641 TGACCCGGGC TGTGTAATAG CCAAAATGCA ACTGGACAAC CCCAGCAAGG TCCAGCAGGC  
 2701 TGAGCTTCAC ACAGGCAGTC TGCCACGGAT CCAGAGCACA GCGCTCAGAG GCGAGAAGCT  
 2761 CCACCGAGTG TTCCACTATG TCCTGGATAA TCTGGTCAAT GTGATGAATG GATACCTGCT  
 2821 TCCAGATCCT TTCTTTAGCA GCAGGGTGAA AGACTGGGTG GAACGGTTGA TGAAGACCTT  
 2881 CAGAGACCCC TCCTTGCCCTC TCCTAGAATT GCAGGATATC ATGACTAGCG TCTCTGGTCG  
 2941 TATCCCGCCC AACGTGGAAG AGTCTATCAA GAAGGAAATG GCTCAGTATG CCAGCAACAT  
 3001 CACATCCGTG CTCTGTCACT TTCCAGCCA GCAGATTGCC AACATCCTAG ACAGCCACGC  
 3061 AGCCACACTG AACCAGAAAT CTGAACGGGA AGTCTTCTTC ATGAACACTC AGAGCATCGT  
 3121 CCGAGTGGTG CAGAGGTACC GCACTGGCAT CCGAGGACAT ATGAAGGCTG TGGTGTATGA  
 3181 CCTGCTGCGG CAGTACCTGC GAGTAGAGAC ACAATTCCAG AACGGTCACT ATGACAAATG  
 3241 CGTGTTCGCC CTCGGGGAGG AGAACAAGAG TGATATGAAC ACTGTGCTGA ACTACATCTT  
 3301 CTCTCATGCT CAGGTACCA GGAAGAATCT TCTGGTCACC ATGCTTATCG ATCAGCTGTG  
 3361 TGGCCGGGGC CCCACCCTCA CTGATGAGCT GCTGAATATC CTCACGGAGC TAACTCAACT

Fig. 2B

3421 CAGCAAGACC ACCAACGCGA AGGTGGCGCT CCGAGCACGC CAGGTTCTTA TTGCTTCCCA  
 3481 TTTGCCATCC TATGAGCTTC GCCTCAACCA AGTCGAGTCT ATCTTCCTAT CCGCCATTGA  
 3541 CATGTATGGA CACCAGTTCT GCATCGAGAA CCTGCAGAAA CTCATCTTGT CCGAAACGTC  
 3601 GATTTTGGAT GTCCTACCAA ACTTCTTCTA TCACAGCAAC CAGGTCGTGA GGATGGCAGC  
 3661 TCTGGAGGTG TATGTTTCGAA GGGCTTATAT CGCCTATGAA CTTAATAGCG TACAACACCG  
 3721 GCAGCTGAAG GACAACACCT GCGTGGTGGA ATTCCAGTTC ATGCTGCCCC CATCGCATCC  
 3781 AAATAGAGGG AACATCCCCA CGCTAAACAG AATGTCCTTC TCCTCCAACC TCAACCACTA  
 3841 CGGCATGACT CACGTAGCCA GTGTCAGCGA CGTGCTGCTG GACAACGCGT TCACTCCGCC  
 3901 GTGTCAGCGG ATGGGCGGGA TGGTCTCTTT TCGGACCTTT GAAGATTTTG TCAGGATCTT  
 3961 TGATGAAGTG ATGGGCTGCT TCTGTGATTC CCCACCCCAA AGCCCGACAT TCCCTGAGGC  
 4021 AGGTCACACG TCTCTGTATG ACGAAGACAA GGTCCCCAGG GATGAACCAA TTCACATTTT  
 4081 GAATGTGGCT ATCAAAACAG ACTGTGACAT CGAGGATGAC AGTCTAGCAG CTATGTTCCG  
 4141 AGAGTTTACC CAGCAAAACA AAGTACCCT GGTGAACAT GGGATCCGAC GCCTTACTTT  
 4201 CCTGGTTGCA CAAAAGGATT TCAGGAAACA AGTCAACTAT GAAGTGGATC AGAGATTTC  
 4261 TAGAGAATTT CCTAAATTTT TCACGTTCCG AGCAAGGGAT AAGTTTGAGG AAGATCGTAT  
 4321 CTATCGTCAC CTGGAGCCTG CCCTAGCTTT CCAGTTAGAG CTGAACCGGA TGAGAAATTT  
 4381 TGACCTTACT GCCATCCCGT GTGCCAATCA CAAGATGCAC TTGTATCTTG GGGCAGCCAA  
 4441 GGTAGAAGTG GGCACAGAAG TGACAGACTA CAGGTTCTTT GTTCGTGCAA TCATCAGGCA  
 4501 TTTCTGATCTG GTCACCAAGG AAGCTTCCTT TGAATATCTA CAAAATGAAG GGGAGCGGCT  
 4561 CCTCTCGGAA GCCATGGATG AGTTGGAAAG CGCCTTTAAC AATACAAATG TCCGGACTGA  
 4621 CTGCAACCAC ATCTTCCTCA ACTTTGTTCC TACAGTCATC ATGGACCCAT CGAAGATTGA  
 4681 GGAATCCGTG CGGAGCATGG TGATGCGCTA TGAAGTCGG CTGTGGAAGC TGCGTGTCCCT  
 4741 CCAGGCAGAA CTGAAAATCA ACATTCCGCT GACACCAACT GGAAAAGCAA TTCCCATCCG  
 4801 CCTCTTCCTG ACGAACGAGT CTGGCTATTA CTTGGACATC AGCCTGTACA AGGAAGTGAC  
 4861 TGATTCCAGG ACAGCACAGA TCATGTTTCA GGCATATGGA GACAAACAGG GACCATTACA  
 4921 TGGAAATGTTA ATCAACACTC CGTACGTGAC CAAAGACCAG CTTCAATCCA AGAGGTTCCA  
 4981 GGCACAGTCC TTAGGGACAA CATACATATA TGACATCCCA GAAATGTTTC GGCAGTCCCT  
 5041 GATCAAACCT TGGGAATCTA TGTCCTCCCA AGCATTCCTT CCACCGCCCC CTCTGCCTTC  
 5101 AGACATACTG ACGTACACTG AGCTCGTGTT GGATGATCAA GGTCAACTGG TTCACATGAA  
 5161 CAGGCTTCCA GGAGGAAATG AGATTGGCAT GGTAGCTTGG AAAATGACCC TTAAGAGTCC  
 5221 AGAATATCCA GACGGCCGAG ATATCATTTG TATTGGCAAT GACATCACTT ACCGAATTGG  
 5281 GTCCTTTGGA CCCCAAGAGG ATTTGCTGTT TCTCAGAGCT TCTGAGCTTG CCAGGCAGGA  
 5341 GGGCATCCCA CGCATCTATG TAGCAGCCAA CAGTGGAGCA AGAATTGGAC TGGCAGAGGA  
 5401 AATTCGTAT ATGTTTCACG TGGCCTGGGT AGATCCTGAG GATCCTTACA AGGGATACAA  
 5461 ATATTTATAT CTGACCCCTC AAGATTACAA GAGAGTCAGT GCTCTCAACT CTGTCCATTG  
 5521 TGAACATGTG GAAGATGAAG GAGAATCCAG GTACAAGATC ACTGACATTA TTGGGAAGGA  
 5581 AGAAGGACTT GGAGCAGAGA ACCTTCGAGG GTCTGGAATG ATTGCTGGGG AATCCTCGTT  
 5641 GGCCTACGAC GAGATCATCA CCATCAGCCT GGTTCATGTC AGGGCCATTG GGATTGGGGC  
 5701 TTACCTCGTC CGACTGGGAC AGAGAACCAT CCAGTTCGAA AATTCTCACT TAATCCTGAC  
 5761 AGGAGCTGGG GCCCTCAACA AAGTCCTCGG TAGGGAAGTA TACACCTCCA ACAACCAGCT  
 5821 GGGGGGCATC CAGATCATGC ACAACAATGG GGTGACGCAC AGCACCGTCT GTGACGACTT  
 5881 CGAGGGGGTG TTCAACCTCC TGCACTGGCT GTCTTACATG CCGAAGAGTG TATACAGTTC  
 5941 AGTTCCTCTC CTGAACTCCA AGGATCCAAT AGACAGAGTC ATCGAGTTTG TGCCACAGAA  
 6001 GCGCGCGTAT GACCCTCGGT GGATGCTGGC AGGCCGGCCT CACCCCAACC AGAAAGGTCA  
 6061 GTGGTTGAGT GGATTTTTTG ACTATGGCTC TTTCTCAGAG ATCATGCAAC CGTGGGCACA  
 6121 GACTGTGGTG GTTGGCAGAG CCAGGCTAGG AGGAATACCC GTGGGAGTAG TTGCCGTAGA  
 6181 AACCCGAACA GTGGAGCTGA GCATCCCGGC TGATCCTGCA AACCTGGATT CTGAAGCCAA  
 6241 GATTATCCAG CAGGCTGGCC AGGTTTGGTT CCCAGACTTC GCGTTTAAGA CGTATCAGGC  
 6301 CATTAAGGAC TTCAACCGTG AAGGGCTGCC TCTGATGGTC TTTGCCAACT GGAGAGGCTT  
 6361 CTCCGGTGGG ATGAAAGATA TGTACGACCA GGTGCTGAAG TTCGGCGCTT ACATCGTGGA  
 6421 CGGCTTACGG GAGTGCTCGC AGCCCGTGAT GGTCTACATC CCGCCTCAGG CCGAGCTCCG  
 6481 AGGCGGCTCC TGGGTGGTGA TTGACCCAC CATCAACCCG CGGCACATGG AGATGTATGC  
 6541 GGACCGCGAG AGCAGGGGAT CCGTTCCTGA GCCGGAAGGG ACAGTCGAAA TCAAATCCG  
 6601 CAGAAAGGAT CTGGTGAAAA CCATGCGTCC GGTGGACCCA GTCTACATCC ACTTGGCTGA  
 6661 GCGATTGGGT ACCCCCGAGC TCAGCGTGGC CGAGCGGAAG GAGCTGGAGA GCAAGCTGAA  
 6721 GGAGCGAGAG GAGTTCCTCC TTCCCATCTA CCACCAGGTG GCCGTGCAGT TTGCAGACCT  
 6781 GCACGACACC CCGGGCCGCA TGCAGAGAA GGGGTCATT AACGACATCC TGGATTGGAA  
 6841 GAATTACGCG ACCTTCTTCT ACTGGCGGCT GAGGCGGCTG TTGCTGGAGG ACCTGGTCAA  
 6901 CACAAAATC CACAATGCCA ATCCCAGCT GACAGACGGC CAGATCCAGG CCATGCTAAG  
 6961 GCGCTGGTTT GTGGAGGTGG AGGGAACCGT GAAGGCCTAT GTCTGGGACA ACAACAAGGA  
 7021 TCTGGTGGAG TGGCTGGAGA AACAGCTCAC AGAGGAAGAC GCGCTCCGCT CGGTGATTGA  
 7081 AGAGAACATC AAGTACATCA GCAGAGACTA CGTCCTCAAG CAGATCCGCA GCTTGGTCCA  
 7141 GGCCAACCCA GAGGTTGCCA TGGATTCCAT CGTCCACATG ACGCAGCACA TCTCGCCAC  
 7201 CCAGCGAGCA GAAGTCGTTT GATCCTCTC GACGATGGAC TCGCCCTCAA CGTAG

## Pfg. 3A

1 M E G S A E E S K E M R Y Y M L Q R S S M S G L H L V K Q G  
31 R D R K K I D S Q R D F T V A S P A E F V T R F G G N K V I  
61 E K V L I A N N G I A A V K C M R S I R R W S Y E M F R N E  
91 R A I R F V V M V T P E D L K A N A E Y I K M A D H Y V P V  
121 P G G P N N N N Y A N V E L I L D I A K R I P V Q A V W A G  
151 W G H A S E N P K L P E L L L K N G I A F M G P P S Q A M W  
181 A L G D K I A S S I V A Q T A G I P T L P W S G S G L C V D  
211 W H E N D F S K R I L N V P Q E L Y E K G Y V K D V D D G L  
241 K A A E E V G Y P V M I K A S E G G G G K G I R K V N N A D  
271 D F P N L F R Q V Q A E V P G S P I F V M R L A K Q S R H L  
301 E V Q I L A D Q Y G N A I S L F G R D C S V Q R R H Q K I I  
331 E E A P A A I A T P A V F E H M E Q C A V K L A R M V G Y V  
361 S A G T V E Y L Y S Q D G S F Y F L E L N P R L Q V E H P C  
391 T E M V A D V N L P A A Q L Q I A M G I P L Y R I K D I R M  
421 M Y G V S P W G D A P I D F E N S A H V P C P R G H V I A A  
451 R I T S E N P D E G F K P S S G T V Q E L N F R S N K N V W  
481 G Y F S V A A A G G L H E F A D S Q F G H C F S W G E N R E  
511 E A I S N M V V A L K E L S I R G D F R T T V E Y L I K L L  
541 E T E S F Q L N R I G T G W L D R L I A E K V Q A E R P D T  
571 M L G V V C G A L H V A D V S L R N S I S N F L H S L E R G  
601 Q V L T A H T L L N T V D V E L I Y E G V K Y V L K V T R Q  
631 S P N S Y V V I M N G S C V E V D V H R L S D G G L L S Y  
661 D V S S Y T T Y M K E E V D R Y R I T I G N K T C V F E K E  
691 N D P S V L R S P S A G K L I Q Y I V E D G G H V F A G Q C  
721 Y A E I E V M K M V M T L T A A E S G C I H Y V K R P G A A  
751 L D P G C V I A K M Q L D N P S K V Q Q A E L H T G S L P R  
781 I Q S T A L R G E K L H R V F H Y V L D N L V N V M N G Y C  
811 L P D P F F S S R V K D W V E R L M K T L R D P S L P L E  
841 L Q D I M T S V S G R I P P N V E K S I K K E M A Q Y A S N  
871 I T S V L C Q F P S Q Q I A N I L D S H A A T L N R K S E R  
901 E V F F M N T Q S I V Q L V Q R Y R S G I R G H M K A V V M  
931 D L L R Q Y L R V E T Q F Q N G H Y D K C V F A L R E E N K  
961 S D M N T V L N Y I F S H A Q V T R K N L L V T M L I D Q L  
991 C G R G P T L T D E L L N I L T E L T Q L S K T T N A K V A  
1021 L R A R Q V L I A S H L P S Y E L R L N Q V E S I F L S A I  
1051 D M Y G H Q F C I E N L Q K L I L S E T S I F D V L P N F F  
1081 Y H S N Q V V R M A A L E V Y V R R A Y I A Y E L N S V Q H  
1111 R Q L K D N T C V V E F Q F M L P T S H P N R G N I P T L N  
1141 R M S F S S N L N H Y G M T H V A S V S D V L L D N A F T P  
1171 P C Q R M G G M V S F R T F E D F V R I F D E V M G C F C D  
1201 S P P Q S P T F P E A G H T S L Y D E D K V P R D E P I H I  
1231 L N V A I K T D C D I E D D S L A A M F R E F T Q Q N K A T  
1261 L V E H G I R R L T F L V A Q K D F R K Q V N Y E V D Q R F  
1291 H R E F P K F F T F R A R D K F E E D R I Y R H L E P A L A  
1321 F Q L E L N R M R N F D L T A I P C A N H K M H L Y L G A A  
1351 K V E V G T E V T D Y R E F F V R A I I R H S D L V T K E A S  
1381 F E Y L Q N E G E R L L L E A M D E L E V A F N N T N V R T  
1411 D C N H I F L N F V P T V I M D P S K I E E S V R S M V M R  
1441 Y G S R L W K L R V L Q A E L K I N I R L T P T G K A I P I  
1471 R L F L T N E S G Y Y L D I S L Y K E V T D S R T A Q I M F  
1501 Q A Y G D K Q G P L H G M L I N T P Y V T K D Q L Q S K R F  
1531 Q A Q S L G T T Y I Y D I P E M F R Q S L I K L W E S M S S  
1561 Q A F L P P P P L P S D I L T Y T E L V L D D Q G Q L V H M  
1591 N R L P G G N E I G M V A W K M T L K S P E Y P D G R D I I  
1621 V I G N D I T Y R I G S F G P Q E D L L F L R A S E L A R A  
1651 E G I P R I Y V A A N S G A R I G L A E E I R H M F H V A W  
1681 V D P E D P Y K G Y K Y L Y L T P Q D Y K R V S A L N S V H  
1711 C E H V E D E G E S R Y K I T D I I G K E E G L G A E N L R



Fig. 3B

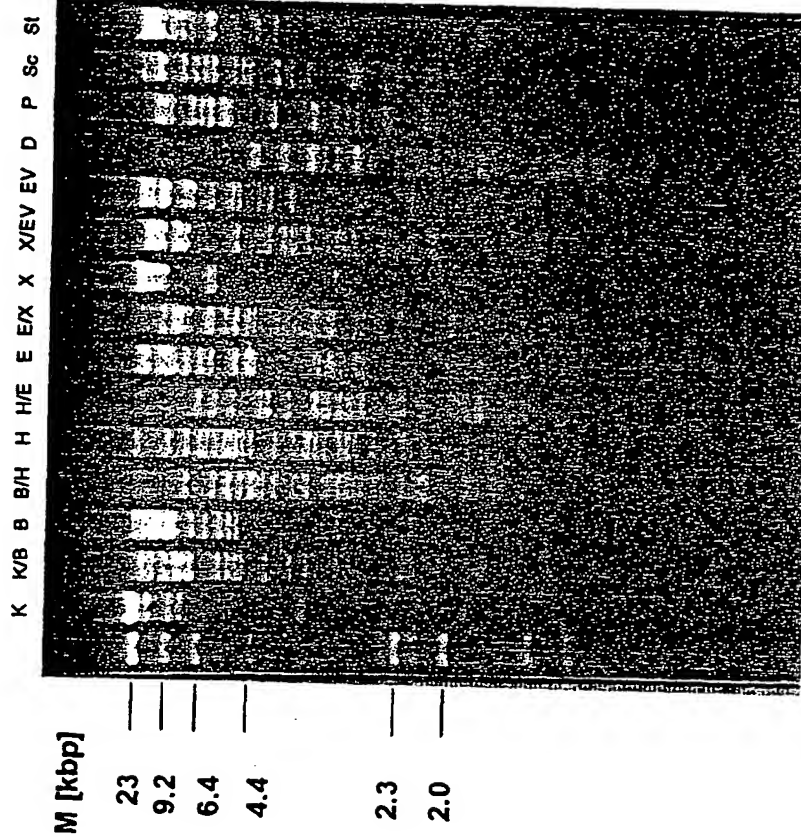
```

1741 G S G M I A G E S S L A Y D E I I T I S L V T C R A I G I G
1771 A Y L V R L G Q R T I Q V E N S H L I L T G A G A L N K V L
1801 G R E V Y T S N N Q L G G I Q I M H N N G V T H S T V C D D
1831 F E G V F T V L H W L S Y M P K S V Y S S V P L L N S K D P
1861 I D R V I E F V P T K A P Y D P R W M L A G R P H P T Q K G
1891 Q W L S G F F D Y G S F S E I M Q P W A Q T V V V G R A R L
1921 G G I P V G V V A V E T R T V E L S I P A D P A N L D S E A
1951 K I I Q Q A G Q V W F P D S A F K T Y Q A I K D F N R E G L
1981 P L M V F A N W R G F S G G M K D M Y D Q V L K F G A Y I V
2011 D G L R E C S Q P V M V Y I P P Q A E L R G G S W V V I D P
2041 T I N P R H M E M Y A D R E S R G S V L E P E G T V E I K F
2071 R R K D L V K T M R R V D P V Y I H L A E R L G T P E L S V
2101 A E R K E L E S K L K E R E E F L L P I Y H Q V A V Q F A D
2131 L H D T P G R M Q E K G V I N D I L D W K T S R T F F Y W R
2161 L R R L L L E D L V K K K I H N A N P E L T D G Q I Q A M L
2191 R R W F V E V E G T V K A Y V W D N N K D L V E W L E K Q L
2221 T E E D G V R S V I E E N I K Y I S R D Y V L K Q I R S L V
2251 Q A N P E V A M D S I V H M T Q H I S P T Q R A E V V R I L
2281 S T M D S P S T *
    
```

Fig. 4

	60	70	80	90	100
Accα	LSDLGISSLQDGLALHMRSSMSGLHLVKQGRDRKKIDSQRDF				
	::::::::::::::::::::::::::::::::				
Accα_MD	MEGSAEESKEMRYMLQRSSMSGLHLVKQGRDRKKIDSQRDF				
	10	20	30	40	

Fig. 5A



**Fig. 5B**

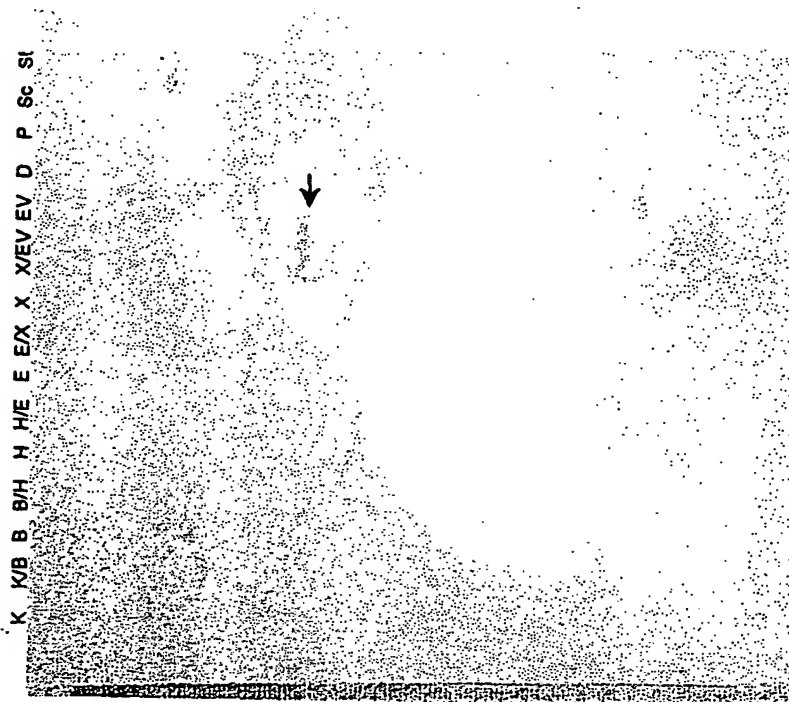
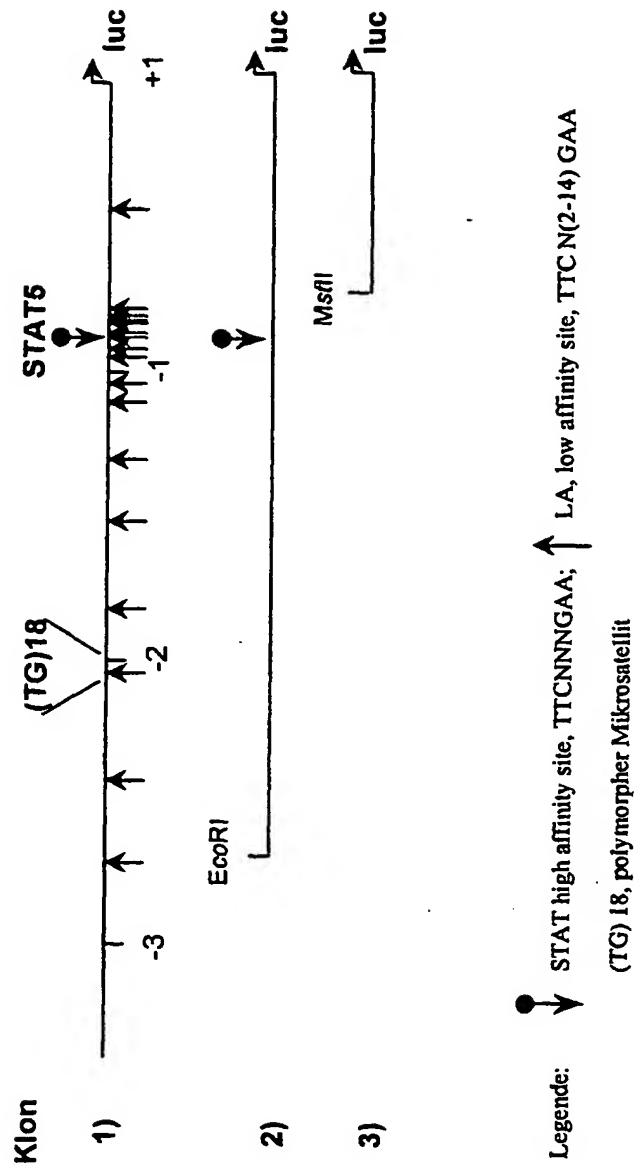


Fig. 6A



Nummer:  
Int. Cl.7:  
Offenlegungstag:

DE 199 46 173 A1  
C 12 N 9/00  
5. April 2001

Fig. 6B

*Expression in HC-11 Zellen (stabil transfiziert, 10<sup>3</sup> RLU/ 10<sup>4</sup> cells)*

Klon	A		B		Verhältnis B/A
	nicht-induziert		Induziert		
	Mittel ± S.E.M.		Mittel ± S.E.M.		
1	338.3 ± 24.2		1169 ± 138.4		3.5
2	218.7 ± 29.5		120.2 ± 31.3		0.6
3	21.3 ± 2.3		24.7 ± 6.1		1.2

n, 3; S.E.M.: mittlerer Fehler des Mittelwertes (s/ Quadratwurzel aus n)

Fig. 7

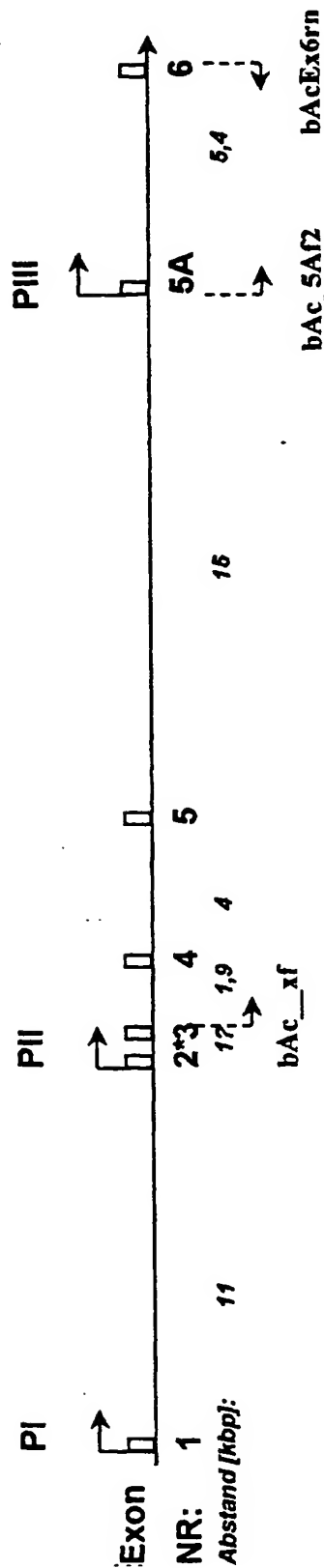
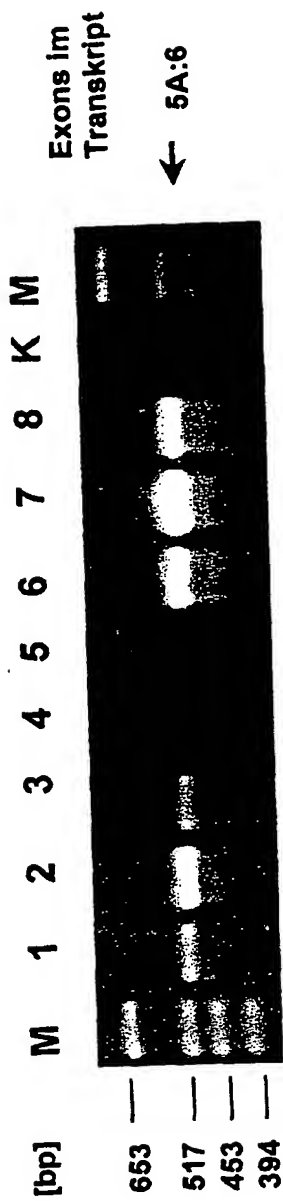


Fig. 8

Transkripte von PIII (Primer bAc\_5Af2 / bAcEx6m)



Transkripte von PII (konstitutiv aktiv; Primer bAc\_xf / bAcEx6m)

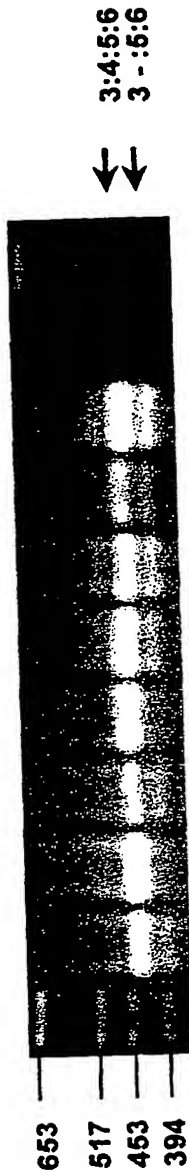
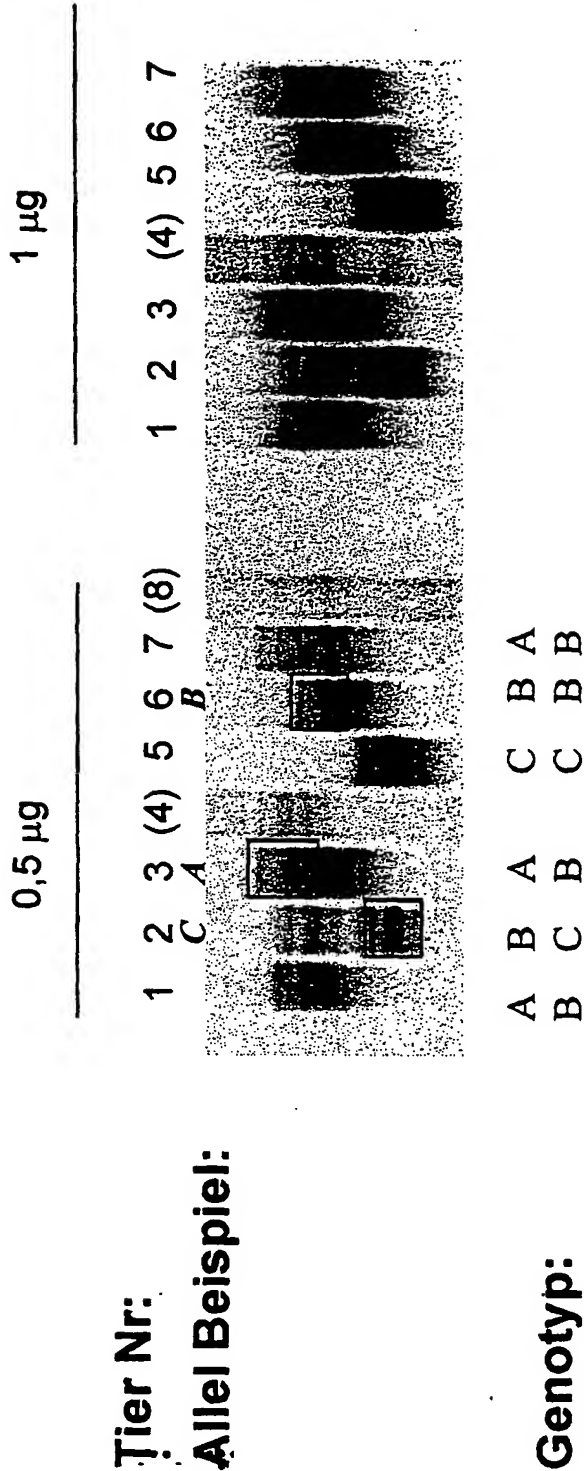


Fig. 9





**N w nucl ic acid encoding bovin ac tyl co nzyme A carboxylase alpha  
and its promoter, for milk-sp cific production of proteins and for  
r gulating fat content of milk**

Patent Number: DE19946173  
Publication date: 2001-04-05  
Inventor(s): SEYFERT HANS MARTIN (DE)  
Applicant(s): FORSCH DIE BIOLOG LANDW LICHER (DE)  
Requested Patent: ☐ DE19946173  
Application Number: DE19991046173 19990920  
Priority Number(s): DE19991046173 19990920  
IPC Classification: C12N9/00; C12N5/16  
EC Classification: C12N9/00L  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

A nucleic acid (I) comprising: (i) a sequence (S1) of 3690 base pairs (bp) or a sequence (S2) of 7255 bp; (ii) allelic variants of (i); or (iii) fragments of (i) or (ii) containing nucleotides (nt) 933-966, 2188-2219 or 3055-3495 of (S1), nt 1-441 of (S2), or the corresponding regions of their allelic variants, is new. Independent claims are also included for the following: (1) vectors that contain (I); (2) an expression vector containing a nucleic acid that includes the 2188-2219 nt region of (S1); (3) host cells containing a vector of (1) or (2); (4) a transgenic, non-human animal containing cells of (3); (5) producing a non-human transgenic mammal in which the milk has reduced fat content; and (6) genotyping cattle by analyzing the nt 933-966 region of (S1).

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2